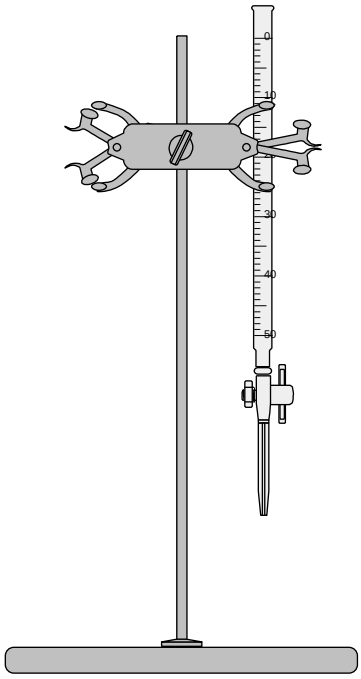
ECOLE NATIONALE DE MEDECINE VETERINAIRE
SIDI THABET

Année 2014-2015



Travaux Pratiques de Pharmacie & Toxicologie

PHARMACIE & TOXICOLOGIE
Pr Agrégé Samir BEN YOUSSEF
Dr Jamel BELGUITH
Dr Rim HADIJI

PREMIERE PARTIE
GÉNÉRALITÉS

CONSIGNES
EN CAS D'ACCIDENT

- En cas de coupure, de piqûre, de brûlure, informer immédiatement le responsable de la salle pour que soient prises toutes les mesures nécessaires.
- En cas de projection de caustique (acide ou base) localisée à une partie du corps (face, œil, bras), lavez immédiatement à grande eau sous le robinet avant d'entreprendre d'autres mesures (application d'antiseptique : solution d'ammonium quaternaire, dérivés mercuriels, pansements au tulle gras) ;
- En cas de projection de caustique généralisée ou d'inflammation des vêtements, utilisez la douche située dans le laboratoire ;
- En cas d'inflammation des vêtements, enroulez la personne dans une couverture ;
- Ne pas déshabiller le brûlé (les flammes en carbonisant, les vêtements les ont rendus stériles). L'allonger et le couvrir pour éviter qu'il ne se refroidisse.
- Aucun traitement local.
- Bien entendu, rassurer le brûlé.
- Il s'agit ensuite d'un problème d'évacuation rapide dans de bonnes conditions dans le centre spécialisé de traitement le plus proche.
- En cas d'incendie, fermez les robinets de gaz et utilisez les extincteurs en attaquant la base des flammes.

SECOURS D'URGENCE DES BRULURES CHIMIQUES

Les brûlures chimiques ou caustifications (caustique de kaustikos = bruler) ne se rencontrent pas aussi fréquemment que les brûlures thermiques. Ce sont parfois des accidents professionnels, de plus rares en raison des précautions prises, et le plus souvent des accidents domestiques.
Les conséquences en sont particulièrement graves lorsque les yeux sont touchés.

Nombreux sont les produits chimiques à caractère agressif pour l'organisme :

- **les acides forts** : nitrique, sulfurique, chlorhydrique, fluorhydrique…etc.
- **les bases fortes** : soude caustique, potasse, ammoniaque, …etc.

- **des produits divers** : brome et chlore liquide, phénol, phosphore, sodium, hydrazine…etc.
- **les « gaz » de combat vésicants** : sulfure d'éthyle dichloré ou ypérite (gaz moutarde), trichloréthylamine, chlorovinylarsine ou lewisite…etc.

En raison de leurs connaissances chimiques, les pharmaciens sont particulièrement compétents pour connaitre les dangers de ces composés, et les soins à apporter aux blessés.

Ils se rappelleront que la règle d'or dans ce domaine est la rapidité d'action.

MODE D'ACTION DES CAUSTIQUES

Les caustiques agissent, soit :

- par action directe sur la peau ou les muqueuses,
- par ingestion accidentelle,
- par inhalation de vapeurs ou d'aérosols.

Ce dernier cas, doit être assimilé à l'intoxication par les gaz suffocants, tels que le chlore ou le phosgène.

Le secours d'urgence consiste alors en une évacuation rapide en position allongée, dans l'immobilité absolue, vers un service hospitalier **(CAMU : 10, Rue Abou Kacem CHEBBI, Monfleury, TUNIS, Téléphone : 71341807)**. En aucun cas, il ne faut faire de respiration artificielle.

Les caustiques ne sont dangereux qu'à forte concentration : dilués, ils sont pratiquement inoffensifs.

Le mode d'action des acides et des bases est différent.

- **Les acides forts** (sulfurique, nitrique…etc.) sont des caustiques coagulants, qui forment avec les tissus et le sang des composés insolubles. Ils produisent des escarres sèches avec rétraction considérable des tissus.
  D'emblée, les brulures prennent sont du troisième degré.
- **Les bases fortes** (soude, potasse…etc.) sont des caustiques liquéfiants avec une action élective sur les matières grasses qu'elles saponifient.
  Elles produisent des escarres molles qui lorsqu'elles tombent, provoquent des hémorragies secondaires.

Il est indispensable de faire préciser très vite la nature du produit en cause, et si nécessaire de l'identifier rapidement avant que d'intervenir.

- **CAS DES BRULURES PAR LES ACIDES CORROSIFS**

Acide nitrique HNO_3 : c'est le plus puissant de tous. Il produit d'abord sur la peau de taches jaunes (dues à la formation de dérivés nitrés du groupe tyrosine des protéines épidermiques) puis une nécrose locale des tissus. L'inflammation provoquée est douloureuse.
Identification : HNO_3 donne une couleur bleue avec la diphénylamine, rouge avec la brucine en milieu sulfurique.

Acide sulfurique H_2SO_4 : (vitriol en criminologie). Il agit très rapidement sur la peau. La sensation douloureuse, en l'absence de neutralisation, n'apparaît qu'au bout de deux ou trois minutes et devient de plus en plus cuisante. On note une destruction du derme et de l'épiderme ; les taches blanches ou grises deviennent brunes, puis noires. Ses plaies sont longues à guérir, laissant des cicatrices disgracieuses en bourrelets (chéloïdes).
Identification : H_2SO_4 donne un précipité blanc abondant avec le chlorure de baryum en milieu nitrique.

Acide chlorhydrique HCl : Il n'attaque la peau qu'au bout de cinq minutes, ce qui laisse largement le temps de l'éliminer. Produit des escarres noires ; des taches rouge vif sur les vêtements.
Identification : HCl donne un précipité blanc avec le nitrate d'argent ; des fumées blanches avec l'ammoniaque.

Acide fluorhydrique HF : Il attaque la peau à toutes concentrations ; la solution à plus de 60% produit une brulure grave, douloureuse à retardement.
Identification : HF attaque le verre ; un papier imprégné d'une solution d'oxychlorure de zirconium et d'alizarine sulfonate de sodium, humidifié par l'acide acétique, vire du pourpre au jaune lorsqu'il est suspendu au dessus d'une solution de HF.

A. Secours d'urgence des brûlures par projection

Que faut-il faire ?

- Faire vite,
- Essuyer à sec avec un chiffon, du papier buvard…etc., puis laver immédiatement et à grande eau (douche si nécessaire) pendant au moins dix minutes,
- Oter les vêtements souillés,
- Eviter l'eau chaude, car la vasodilatation périphérique accroît la résorption cutanée,
- On peut ensuite saupoudrer à sec avec du bicarbonate ou du carbonate de sodium, de l'oxyde ou du carbonate de magnésium,
- Ou tamponner avec une solution à 5% de carbonate de sodium et 5% de thiosulfate de sodium ou une solution à 10% de triéthanolamine (ex : Biafine®),

- En aucun cas n'utiliser les bases fortes.
- Pour l'acide fluorhydrique, il est conseillé d'immerger la partie atteinte dans l'alcool à 70° additionné de glace, pendant une heure, permettant ainsi la diffusion de HF dans l'alcool, suivie de l'injection *in situ* d'une solution de gluconate de calcium à 10%.

B. Secours d'urgence lors de brûlures de l'œil par projection de produits chimiques

L'acide sulfurique est le plus dangereux de tous. La conjonctive devient blanche, avec risque de rétraction cicatricielle des culs de sac conjonctivaux ; la cornée est dépolie et prend une teinte blanche qui peut l'opacifier en partie ou en totalité. La perte de la sensibilité normale cornéenne est un signe de gravité.
Il y a risque de perte de l'œil par infection, glaucome secondaire, iridocyclite ou décollement de la rétine.

Que faut-il faire ?

Très vite, irriguer l'œil pendant au moins quinze minutes.
Mieux : laver à l'eau tiède ou avec un soluté isotonique (ex : Dacurose®).

- **CAS DES BRULURES PAR LES BASES FORTES**

A. Secours d'urgence des brûlures par projection

La sensation douloureuse est beaucoup moins intense qu'avec les acides : l'action est moins rapide et donne davantage de temps pour la neutralisation.
En cas d'atteinte prolongée, des escarres molles, humides, à surface savonneuse apparaissent.
Des ulcérations profondes font suite à la chute de l'escarre, avec hémorragie. Si le cuir chevelu est atteint, les cheveux s'arrachent par touffes entières.

Que faut-il faire ?

Laver tout de suite à grande eau comme pour un acide. Tamponner ensuite avec une solution faiblement acide telle que :

- acide acétique au 1/10ème ou au vinaigre au 1/3,
- ou solution d'acide citrique au 1/10ème,
- ou à l'eau boriquée à saturation,
- ou au jus de citron.
- Pour la soude : utiliser une solution à 5% de chlorure d'ammonium.
- Pour l'ammoniaque NH_4OH: utiliser une solution de formol au 1/20ème (transformation de NH_3 en méthénamine).

B. Secours d'urgence des brûlures par projection dans l'œil

Il faut un lavage rapide de l'œil à l'eau ordinaire comme dans le cas d'un acide, puis une irrigation (sans compression) avec une solution à 5% de chlorure d'ammonium, suivie d'un lavage avec une solution saturée tiède d'acide borique. Poursuivre longtemps le lavage : au moins une heure.
Bien entendu, après la mise d'un pansement lâche, contacter d'urgence un ophtalmologiste.

C. Secours d'urgence des brûlures par ingestion

Les signes cliniques sont identiques lors d'ingestion d'acide ou de base. La muqueuse labiale et celle de la langue deviennent blanches et partent en lambeaux ; la déglutition est impossible, la douleur est atroce.
Un état de choc très marqué s'ensuit.
Dose létale : 8 à 10 g de soude ou de potasse caustique.

Que faut-il faire ?

Ne pas faire vomir (ni manœuvres, ni vomitifs). Pas de tubage gastrique.

Par contre faire boire :

- eau vinaigrée : 50 g de vinaigre dans un litre d'eau,
- ou acide acétique dilué à 1%,
- ou sirop d'acide citrique codex,
- ou jus de citron étendu d'eau ou jus d'orange en abondance.

Envoyer d'urgence au CAMU.

Chapitre 1er

PREPARATION DES TRAVAUX PRATIQUES

I. AVANT LA SEANCE

Les travaux pratiques ne présentent d'intérêt pour l'étudiant que dans la mesure où il les aura au préalable bien préparés. En effet, les travaux pratiques ont pour but d'illustrer le cours de Pharmacie & Toxicologie à l'aide de manipulations qui se font moyennant des réactions et des principes formant les bases de la pharmacie chimique.

Les séances de TP nécessitent de se reporter aux notes de cours, et au fascicule de TP où figurent l'essentiel des informations.

Cela permettra d'une part de comprendre le principe des réactions à réaliser et les raisons de leur mise en œuvre, donc de faire un compte rendu qui sera noté, de poser éventuellement lors de la séance des questions, de discuter les résultats obtenus et d'autre part d'organiser et de planifier la manipulation pour effectuer sans improvisation, ni précipitation l'ensemble des réactions prévues (occupation des temps morts par la mise en œuvre de réactions ou de temps opératoires rapides, par le nettoyage du matériel utilisé…etc.).

II. PENDANT LA SEANCE

Travailler prudemment, proprement et avec ordre.

1. Travailler prudemment

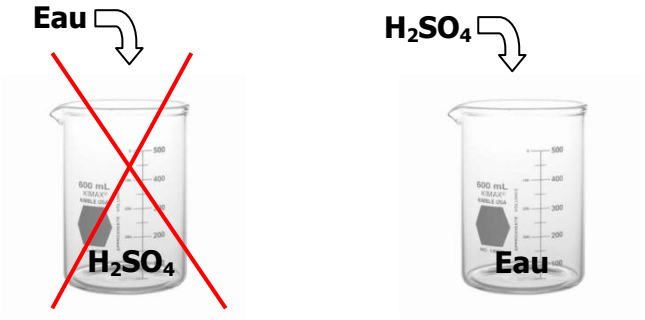
Nous insistons particulièrement sur le respect des règles de sécurité, tous les accidents qui peuvent se produire sont généralement dus à leur non observation.

- Protégez-vous en portant une blouse confectionnée dans une matière non inflammable. Les blouses synthétiques sont à éviter ;
- Ne manipulez jamais de liquide inflammable (éther, sulfure de carbone) à proximité d'une flamme (les vapeurs de l'éther forment avec l'air un mélange explosif) ;
- En chauffant un tube, ne dirigez jamais l'orifice vers vous ou vers vos voisins (risque de projection de liquide dans les yeux, sur le visage…etc.) ;
- Ne jamais chauffer le fond d'un tube, mais la partie médiane de celui-ci pour éviter les projections ;

- Ne jamais verser de l'eau ou une solution aqueuse dans l'acide sulfurique concentré (réaction exothermique violente et projections).
- Procédez inversement pour éviter les projections d'acide sulfurique.
- Ne jamais pipeter à la bouche les produits chimiques, en l'occurrence les acides et les bases. Les solutions concentrées d'acides et de bases ainsi que les solutions toxiques ne doivent être aspirées qu'en utilisant une poire d'aspiration (propipette).

2. Travailler proprement

- Eviter de répandre de l'eau ou des réactifs sur les paillasses et le sol, nettoyer immédiatement ;
- Ne posez jamais les bouchons des récipients sur les paillasses et sur les rayons. Cela entraîne une altération des réactifs contenus ;
- En versant un réactif, tenir l'étiquette en position supérieure, de façon à ne pas la maculer ;
- Nettoyer à l'eau ordinaire votre matériel au fur et à mesure de son emploi.



3. Travailler avec ordre

- Vérifiez tout d'abord que l'ensemble du matériel et des réactifs prévus pour la manipulation figure sur votre paillasse ;
- N'utilisez que les produits et le matériel expressément prévus et conseillés pour chaque manipulation ;
- Remettez chaque chose à sa place aussitôt après chaque usage ; vous risquez si non de faire perdre du temps à vos camarades, étiquettes en face de vous et par ordre alphabétique.

III. A LA FIN DE LA SEANCE

- Lavez à l'eau ordinaire tout le matériel utilisé. N'employez ensuite l'eau distillée que pour rincer la verrerie graduée (éprouvettes, pipettes, burettes). Laissez les burettes remplies d'eau distillée ;
- Remettez en ordre le matériel utilisé ainsi que les réactifs ;
- Nettoyez enfin votre poste de travail.

Chapitre 2

MATERIEL ET PROCEDES GENERAUX D'ANALYSE

Dans ce chapitre sont traitées des notions directement utiles, pour la réalisation des travaux pratiques prévus dans ce polycopié.

I. RECIPIENTS

La plupart sont en verre résistant borosilicaté (verre pyrex). Quelques uns sont en porcelaine blanche. Les récipients utilisés pour la mesure précise des volumes sont décrits au chapitre volumétrie.

- **Ampoules à décanter** : elles sont utilisées pour l'extraction liquide-liquide d'un composé par partage entre deux phases non miscibles. Après introduction de la phase contenant la substance à extraire puis celle servant à l'extraction, on retourne l'ampoule et dans cette position on agite l'ensemble de manière à assurer un contact intime entre les deux, on pose ensuite l'ampoule retournée dans son sens normal sur son support. Après décantation et séparation des deux phases, on récupère la phase la plus dense en ouvrant le robinet inférieur et en prenant la précaution d'enlever le bouchon supérieur pour que l'écoulement se fasse régulièrement.

- **Béchers** : leur contenance habituelle va de 50 à 500 ml ; certains sont gradués et permettent des mesures de volumes où la précision est relative.

- **Erlenmeyers ou fiole conique** : leur contenance est en général de 100 à 250 ml. Certains ont une embouchure rodée, ils seront utilisés pour la réalisation de dosages nécessitant une agitation régulière ou violente.

- **Tubes à essais** : ceux utilisés en TP sont des tubes de 16/160 mm dans lesquels une hauteur de 0,6 cm correspond à 1 ml environ de liquide (20 ml = 12 cm).

- **Verres à pied** : ils sont destinés à recueillir les liquides usés et à contenir les bains réfrigérants.

- **Verres de montre** : généralement rodés, ils permettent de porter des poudres à dessiccation au four ou bain de sable à 100°C.

- **Capsules en porcelaine** blanche (fragiles) : elles sont destinées aux dessiccations à haute température soit au four à moufle, soit sur bain de sable.

- **Pissettes en matière plastique** : leur fonctionnement est basé sur la pression exercée par la main sur les parois et transmise au volume d'air contenu en partie supérieure. Il est donc nécessaire de ne pas les remplir complètement d'eau distillée et de les maintenir suffisamment verticales au moment de l'emploi pour que l'extrémité inférieure du tube plongeant reste immergée.

II. FILTRATION

C'est l'opération permettant de séparer dans un mélange hétérogène un solide (précipité), d'un liquide (filtrat).

Elle sera réalisée à l'aide d'un filtre en papier placé dans un entonnoir de dimension convenable et reposant soit sur un tube à essai, soit sur une fiole conique où le filtrat sera recueilli.

On veille à ce que le filtre ne dépasse pas en hauteur les bords de l'entonnoir pour ne pas perdre de filtrat par capillarité.

- Préparation d'un filtre sans plis : à partir d'une rondelle de papier filtre (plus adapté à la récupération du solide).
- Préparation d'un filtre avec plis : à partir d'un carré de papier filtre : pliez en 2 puis en 4 puis en 8, éliminez la partie périphérique à une distance de la pointe égale à la hauteur de l'entonnoir.

III. DESSICATION

On utilise fréquemment des dessiccateurs constitués par une enceinte parfaitement close dans laquelle est placé un dessiccateur constitué soit par de l'anhydride phosphorique, soit par un gel de silice activé par

chauffage (silicagel - dont le degré d'hydratation est rendu visible par l'adjonction de chlorure de cobalt $CoCl_2$. Celui-ci selon le degré d'hydratation du silicagel passe de la couleur rose (6 H_2O) à bleue (déshydraté).

Pour le contrôle des médicaments on est amené plus souvent à faire appel à la chaleur d'une étuve à 70° ou 100°, généralement ventilée ; on réalise souvent une dessiccation dite à « poids constant » : pour cela on continue la dessiccation jusqu'à ce que 2 pesées successives au moins donnent le même résultat.

Cette méthode élémentaire est utilisée pour l'évaluation du degré d'hydratation des médicaments où la présence d'eau est considérée comme préjudiciable (diminution importante du degré de pureté ou impureté défavorable à une bonne conservation), dans d'autres cas, on peut procéder directement au dosage de l'eau par une méthode chimique : méthode Karl-Fischer.

IV. CHAUFFAGE

- **Bec Bunsen :** il ne pourra fonctionner qu'après l'ouverture de la vanne de la bouteille de gaz.
  L'alimentation même du bec est réglée par un robinet à pointeau.
  L'allumage du bec s'effectue en fermant la virole réglant l'admission d'air puis en ouvrant le robinet à pointeau, la flamme est surtout éclairante. En tournant la virole pour admettre de l'air, elle devient incolore, bleutée et chaude.
  Lors du chauffage d'appareillage en porcelaine ou en verre Pyrex (le verre ordinaire ne peut pas être chauffé), il est indispensable d'intercaler une grille métallique entre la flamme et la surface à chauffer. La chaleur sera ainsi diffusée par étalement de la flamme.

- **Chauffage des tubes à essais** : porter la partie médiane du liquide contenu dans le tube, en agitant légèrement, dans la partie chaude de la flamme (au-dessus du cône d'arrivée du mélange air-gaz). Ne jamais chauffer le fond du tube, l'entrée en ébullition de la fraction de liquide qui s'y trouve projetterait la partie supérieure à l'extérieur.

- **Bain marie** : pour la réalisation d'un bain-marie bouillant on place un bécher rempli au ¾ d'eau sur une toile métallique portée par un

trépied support. Ce montage permet une meilleure répartition de la chaleur sur le fond du récipient.

- **Bain de sable :** il est constitué par une résistance chauffante placée dans un matériau réfractaire et recouvert de sable, il permet selon le réglage d'atteindre des températures allant jusqu'à 100°C, dans une ambiance non humide. Il est utilisé généralement pour l'évaporation à sec du contenu de capsules ou de béchers.

V. VOLUMETRIE

La mesure précise des volumes de liquides est réalisée avec de la verrerie graduée.

Avant usage, il convient de s'assurer qu'elle est propre et sèche, sinon elle doit être nettoyée à l'eau distillée, puis rincée avec le liquide que l'on veut mesurer faute de quoi une erreur de dilution serait inévitable.

La lecture doit se faire, le tube gradué étant maintenu verticalement, par effleurement de la partie inférieure du ménisque de la surface liquide avec le trait de graduation, l'œil de l'observateur étant placé au même niveau.

Dans le cas des solutions colorées ou opaques, la partie inférieure du ménisque n'étant pas visible en repérera la partie supérieure : cela se fait sans problème avec les récipients jaugés à 2 traits, mais avec ceux à un trait, il faut utiliser une verrerie spécialement étalonnée pour ce type de méthode de mesure.

1. Pipettes

On utilisera en TP plusieurs variétés pipettes, de précision différente :

- Des pipettes graduées (en ml) : de 5 à 10 ml employées pour mesurer des volumes réactifs sans grande précision.
- Des pipettes à écoulement à 1 trait : le volume distribué ne comporte pas la dernière goutte qui doit rester dans la pipette, donc ne pas souffler dans la pipette.
- Des pipettes à 2 traits : ou le volume distribué correspond à celui déterminé par l'écoulement du liquide entre les 2 traits.

Les mesures réalisées avec ces pipettes jaugées 1 ou 2 traits se font selon la classe de précision du matériel avec une incertitude maximum de 0,05 ml pour 20 ml et 0,025 ml pour 10 ml.
Une telle précision ne peut s'obtenir qu'en utilisant correctement ces pipettes en suivant les directives suivantes :

- Plongez la pointe de la pipette dans le liquide à mesurer et en ayant soin de ne pas mouiller l'extrémité supérieure avec les lèvres,

- Aspirez le liquide jusqu'à ce qui' il dépasse le trait supérieur,
- Bouchez rapidement le haut avec l'index et en maintenant la pipette verticale, la pointe appuyée sur la paroi,
- Laissez s'écouler le liquide lentement ce qu'on obtiendra facilement en diminuant progressivement la pression du doigt sur l'orifice supérieur, si celui-ci est bien sec. Amener ainsi le niveau du liquide au niveau du trait supérieur,
- Transportez la pipette sur le récipient destiné à recevoir le volume ainsi mesuré,
- laissez le liquide s'écouler lentement, la pipette étant maintenue verticalement, la pointe appuyée sur le bord du récipient, jusqu'au niveau du trait inférieur, s'il s'agit d'une pipette à deux traits et jusqu'à écoulement total, s'il s'agit d'une pipette à un trait.

Ne jamais souffler dans une pipette en volumétrie

2. Micropipettes

(1)

- On les utilise pour réaliser des dépôts de quelques µl, notamment en chromatographie sur couche mince. On emploie soit des micro-seringues, soit plus couramment des micropipettes, souvent à usage unique dont la contenance unitaire correspond exactement à la quantité de solution à déposer. Le remplissage de la micro-pipette se fait par capillarité. La micropipette (1) est une micropipette Gilson.

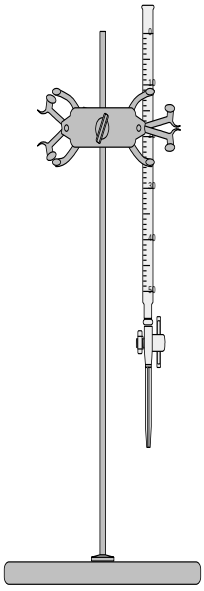
3. Fioles jaugées

- Une fiole jaugée est destinée à préparer des solutions de titre précis, par exemple des solutions étalons. Une fiole jaugée est étalonnée pour contenir un volume précis de liquide. La précision de la fiole jaugée est toujours mentionnée (par exemple : 10 ± 0,025 ml à 20°C). Elles ont la forme de ballons généralement à fond plat et portant un trait de jauge. Elles sont utilisées pour réaliser des solutions titrées ou pour effectuer des dilutions précises. A cet effet, il convient de bien s'assurer de l'homogénéité du milieu en effectuant des retournements nombreux (10 à 20) plutôt qu'une agitation même vive de l'ensemble

4. Eprouvettes graduées

L'éprouvette graduée est un récipient utilisé en laboratoire pour mesurer des volumes de liquides. Une éprouvette est généralement en verre (souvent borosilicaté tel le Pyrex®) ou en matière plastique (polypropylène…etc.). Celles utilisées en TP sont graduées jusqu'à 25 ou 50 ml ; elles servent à mesurer simplement des volumes ou une grande précision n'est pas requise.

5. Burettes graduées



Celles utilisées en TP sont graduées au vingtième de ml (1 division = 0,05 ml).
Elles servent à effectuer les dosages volumétriques à l'aide de solutions préalablement titrées. la délivrance de leur contenu est réglée par un robinet qui peut être en verre rodé lubrifié avec un peu de vaseline, ou plus souvent en téflon ce qui garantit une bonne adhérence sans risque de grippage du rodage.
Emploi : la burette maintenue verticale à l'aide d'un support est au préalable vidée de l'eau distillée dont elle doit être remplie à l'issue de chaque emploi. Le robinet étant fermé, versez 3 à 4 ml environ de la solution titrante par l'orifice supérieur. Rincer les parois de la burette avec ce volume en inclinant la burette libérée de son support puis la replacer sur ce dernier et laisser écouler ce liquide de rinçage par l'extrémité inférieure.

Fermer le robinet puis remplir la burette de réactif titrant. Ouvrir le robinet de façon à chasser les bulles d'air des parties situées en dessous du robinet et amener le ménisque au niveau de la première graduation. Eliminer la goutte qui pourrait pendre à l'extrémité.

Durant le titrage manipuler le robinet d'une main et simultanément agiter la solution à titrer de l'autre. Dès que le titrage est terminé, la burette doit être vidée, rincée à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée et remplie d'eau distillée.
L'erreur sur le volume délivré avec une burette de 10 ml est surtout attribuable aux incertitudes de lecture. Lors de la mise à niveau de départ la visée se fait juste sur une graduation. L'imprécision est infime alors que lors de la lecture du niveau atteint en fin de dosage, l'imprécision peut

atteindre ½ division soit 0,025 ml. Par ailleurs, il ne faut pas oublier lors d'un dosage que la mesure de ce volume sera affectée d'une autre erreur parfois plus importante : celle découlant de la difficulté d'appréciation du point équivalent de la réaction qui est généralement estimé à une goutte près, soit 0,05 ml.

NB : Lors de mesure approximative de petits volumes (jusqu'à 1 ml) on pourra très simplement admettre qu'une goutte = 0,05 ml ; cette approximation sera notamment utilisée lors de l'emploi des réactifs en solution.

NB : Lors d'aspiration de solutions toxiques ou corrosives, il est nécessaire d'utiliser une poire d'aspiration (propipette).

Emploi :

- Enfoncer la poire sur la pipette
- Chasser l'air en appuyant en même temps sur la valve (1) et sur le corps de la poire.
- Appuyer sur (2) pour aspirer la solution
- Appuyer sur (3) pour laisser couler la solution.

VI. GRAVIMETRIE

Les mesures de masse nécessitant une certaine précision (dosage, mesures de constantes physiques ou essais limites) seront réalisés à l'aide de balances de précision mono-plateau d'emploi simple et rapide.

La mise à zéro est toujours nécessaire avant chaque pesée. La lecture du poids mesuré s'effectue directement sur un cadran ou se projette une échelle optique.
Dans le cadre du contrôle des médicaments selon les indications fournies par la pharmacopée, le choix du matériel à utiliser découle de la précision indiquée dans la monographie. Cette indication est donnée de manière conventionnelle par le nombre de décimales qui figurent dans le nombre indiquant le poids à mesurer. L'incertitude admise étant de la moitié de la dernière unité inscrite.

- Exemple 1 :
  Peser avec précision environ 2,40 g : signifie qu'il faut peser à 0,005 g près une masse comprise dans la fourchette 2,395 g - 2,405 g environ (10 p. 100 autour de la valeur indiquée).

- Exemple 2 :
  Peser avec précision environ 5,0 g : signifie qu'il faut peser une masse comprise entre 4,5 g et 5,5 g.

Donc, selon le contrôle, il faut choisir le matériel à utiliser, il est inutile de prendre une balance au mg pour peser une quantité qui ne doit être connue qu'au décigramme près.

Quelle que soit la balance utilisée ou la précision attendue, il faudra vérifier avant toute pesée que l'équilibrage de la balance est bien réglé (niveau à bulle) ; il faudra éviter de s'appuyer sur le support de la balance pour ne pas rompre son équilibre, éviter par ailleurs les courants d'air lors de la pesée.

Noter qu'en certaines circonstances le recours à une balance n'est pas nécessaire et que certaines valeurs données dans les monographies ne sont qu'indicatives, notamment dans la partie identification lorsqu'il s'agit de réaliser des réactions de caractérisation.

Dans tous ces cas on se contentera de prélever avec une spatule une petite quantité du médicament "une pointe de spatule " .

VII. DETERMINATION D'UN POINT DE FUSION AU BANC KOFLER

La mesure de point de fusion instantanée d'un solide est réalisée à l'aide d'un banc métallique chauffant porté à une température régulièrement croissante dans le temps. Celle-ci est lue sur un thermomètre placé dans une loge au sein du banc. En déposant sur sa surface la substance étudiée on note la température à partir de laquelle la fusion est instantanée.

Plutôt que d'utiliser un banc à température croissante linéairement dans le temps, il est prévu au TP d'avoir recours au banc chauffant KOFLER qui permet d'obtenir, après équilibre thermique un gradient linéaire de température dans le sens longitudinal du bloc métallique lui-même.
Les températures ne sont plus repérées par un thermomètre mais par une échelle préalablement connue. La détermination d'un point de fusion ne demande moins qu'une minute.

- **BANC KOFLER**

Corps métallique inoxydable de 360 mm x 40 mm sur lequel un dispositif unilatéral de chauffage électrique produit un gradient de température dans le sens longitudinal. La stabilité thermique est assurée au bout de 40 mn de chauffage.

BANC KOFLER

La lecture des températures est effectuée grâce à une échelle divisée et un dispositif de lecture ; ce dernier est constitué d'un curseur avec index qui se déplace horizontalement sur la graduation avec un gradient de température à sa surface habituellement de 50 à 250 °C.

- **Mise en route**

Le banc KOFLER doit être mis en route environ une demi-heure avant l'utilisation, pour que le gradient de température de la plaque chauffante devienne bien constant.

- **Etalonnage**

Avant de pouvoir être utilisé, un banc KOFLER doit être étalonné, à l'aide de substances étalons à l'état solide dont la température de fusion est connue. Dans la mesure du possible, l'étalonnage doit être fait avec un (ou des) substances étalons de point de fusion voisin de celui de l'échantillon étudié.

- **Mesure**

Avec une spatule, placer une petite quantité de solide bien sec, et finement broyé, du côté le plus froid du banc KOFLER. Déplacer progressivement la poudre vers le coté le plus chaud de la plaque (donc vers la droite) jusqu'à observer la fusion instantanée : on verra une goutte liquide, partie du solide fondu, à côté de la poudre non fondue (du côté le plus froid du banc).
Déplacer le chariot jusqu'à amener le curseur entre goutte liquide et solide. Régler alors l'index pour qu'il indique la température de fusion du solide.

Précision : en opérant dans de bonnes conditions d'étalonnage et en plaçant la substance au milieu du Banc, l'erreur maximale est ± 1 °C.

VIII. Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

La chromatographie est une technique de séparation des constituants organiques d'un mélange, exploitée afin d'identifier ou de doser certains constituants du mélange.
De nos jours, la chromatographie liquide haute performance est une méthode quasi universelle qui a beaucoup concurrencé la chromatographie gazeuse. En effet, alors que la chromatographie en phase gazeuse ne s'applique qu'aux composés volatils qui supportent un chauffage à une température élevée, la chromatographie liquide à haute performance n'est pas limitée de ces contraintes et peut séparer pratiquement tous les mélanges.
La chromatographie liquide haute performance trouve plusieurs applications : en toxicologie analytique, pour la recherche des résidus des médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires d'origine animale et dans le contrôle des médicaments.

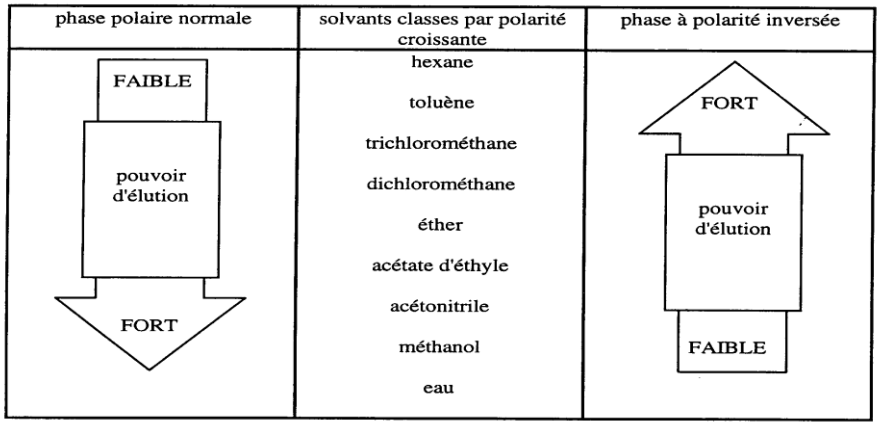
Principe

La chromatographie liquide haute performance est une méthode d'analyse physico-chimique qui sépare les constituants d'un même mélange (les solutés) par entrainement au moyen d'une phase mobile (liquide) le long d'une phase stationnaire (solide), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force d'entrainement (par la phase mobile).

Appareillage

Phase mobile

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants (acétonitrile, méthanol, eau) de polarité variable de pureté analytique (qualité HPLC). Ces solvants sont parfois tamponnés pour faciliter la séparation des différents constituants.



Pompe

Le rôle de la pompe en HPLC est de pousser l'éluant à travers la colonne à une pression élevée et à un débit constant. Elle fonctionne en mode isocratique (concentration constante au cours du temps) ou en mode gradient de concentration (concentrations variables au cours du temps).

Colonne

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 15 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire. Les colonnes les plus utilisées sont de type C_{18} (octadécyl) ou C_8 (octyl).

Détecteur

Les principaux détecteurs utilisés en HPLC sont :

- Détecteur UV

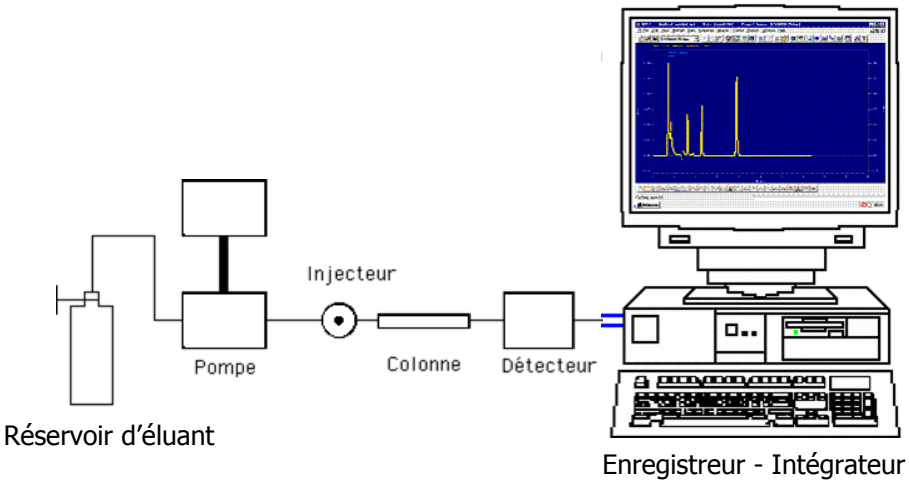
Les molécules à détecter doivent contenir des doubles liaisons conjugués (tétracyclines, sulfamides antibactériens, organophosphorés et carbamates anticholinestérasiques…etc.)

- Barrettes de diodes

C'est une méthode de détection utilisé couplée à la détection UV.

- Détecteur fluorimétrique

Il offre une meilleure sensibilité que le détecteur UV. C'est une méthode de détection applicable seulement pour les composés naturellement fluorescents (fluoroquinolones, tétracyclines, aflatoxines) ou des dérivés rendus fluorescents.



Chromatographe Liquide Haute Performance (HPLC)

Chapitre 2

LE CONTRÔLE DES MEDICAMENTS

Introduction

Lorsque le vétérinaire praticien administre ou prescrit un médicament, il attend de celui-ci une action pharmacologique bien précise et une absence de toxicité. Cette garantie d'efficacité et d'innocuité n'est possible que si l'industriel qui a fabriqué le médicament a effectué des contrôles rigoureux, tout d'abord sur les matières premières entrant dans sa composition et ensuite sur le produit fini.

I. CONTRÔLE DES MEDICAMENTS VETERINAIRES DANS L'INDUSTRIE

A. CONTRÔLE DES MATIERES PREMIERES

Les diverses matières premières achetées par le fabricant doivent répondre aux caractéristiques et aux exigences fixées soit par les pharmacopées, soit fixées dans le dossier d'expertise analytique que doit remettre le fabricant de médicaments vétérinaires pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM).

Les objectifs de ce contrôle sont doubles : un contrôle d'identité et un contrôle de qualité.

1. Contrôle d'identité

Le fabricant est réglementairement tenu de s'assurer que le contenu de chaque récipient de produit qui lui est livré correspond bien à ce qui figure sur l'étiquette.

En effet, les risques d'erreur d'étiquetage de la part des fournisseurs sont d'autant plus grands, que celui-ci fabrique des substances présentant des propriétés organoleptiques voisines.

Lorsque une matière première est inscrite a la pharmacopée, des réactions d'identifications simples sont mentionnées dans la rubrique « identification ». Lorsque la matière première ne figure pas dans la pharmacopée, le fabricant propose lui même des réactions d'identification qui doivent être alors agréés par des experts en pharmacie chimique agrées par l'administration.

2. Contrôle de qualité

S'étant assuré de l'identité des matières premières, le fabricant doit alors s'assure qu'elles répondent a certains critères de qualité, les rendant aptes à l'usage pharmaceutique.

Contrôler la qualité d'une matière première consiste à rechercher la présence d'impuretés provenant de réactions parallèles (isomères) ou de résidus de réactifs.

Les impuretés ne doivent pas dépasser une certaine teneur fixée (limite maximale) par la pharmacopée ou par le dossier d'expertise analytique.

Contrôler la qualité consiste aussi à déterminer la concentration du principe actif (par dosage), celle-ci doit être comprise dans une fourchette de valeurs indiquées par la pharmacopée.

B. CONTRÔLE DU PRODUIT FINI

Le contrôle du produit fini doit répondre aux exigences fixées le plus souvent dans les dossiers d'expertise analytique et plus rarement par les pharmacopées.

L'objectif du contrôle du produit fini est triple : Contrôle d'identité, de qualité et de stabilité.

1. Contrôle d'identité

Une identification est également réalisée sur la présentation commerciale « End User », pour éviter toute erreur d'étiquetage lors du conditionnement.

Cette identification est globale : on vérifie le ou les principes actifs, les excipients ou les adjuvants, et également d'autres caractéristiques générales de la préparation : forme, couleur, consistance, pH des solutés, délitement des comprimés…etc.

2. Contrôle de qualité

On détermine la concentration du principe actif ou la quantité par unité de prise (ex : gélule). On s'assure de l'identité (des excipients, des adjuvants (antioxydants, conservateurs, etc...) et dans certains cas on réalise leur dosage.

Parfois s'imposent des essais biologiques d'activité (antibiotiques), d'innocuité et de stérilité pour toutes les formes pharmaceutiques injectables.

3. Contrôle de stabilité

Une étude expérimentale par vieillissement accéléré (ex : conservation à 40 °C) ou contrôle de la composition après vieillissement à la température ordinaire (étude en temps réel) permet de préciser le délai d'utilisation du médicament assorti d'une date limite de péremption.

Chaque lot de fabrication doit être contrôlé par le fabriquant à l'aide de ses méthodes.

Dans quelques cas, certains contrôles très difficiles à réaliser sur le produit fini, peuvent être effectués en cours de fabrication.

L'ensemble de toutes ces opérations à caractère réglementaire doit être consigné sur le registre de fabrication qui permet de retracer l'historique d'un lot et d'apporter en toute circonstance le témoignage que le fabricant a bien respecté toutes les règles jugées comme indispensables pour garantir la qualité du médicament fabriqué.

Des échantillons peuvent également être prélevés par les inspecteurs pharmaciens et les autres personnes habilitées et adressées au laboratoire de contrôle [LNCM : Laboratoire National de Contrôle des Médicaments, 11 Rue Jebel Lakhdar 1006 Bab Sâadoun – Tunis, Tél : (+216) 71 57 01 17], qui réalise l'ensemble dés vérifications prévues pour ce médicament.

II. CONTRÔLE DES MÉDICAMENTS VETERINAIRES PAR LE PHARMACIEN ET LE VETERINAIRE

Le contrôle des médicaments vétérinaires est également effectué par le pharmacien dans son officine et par le vétérinaire dans son cabinet.

Ce contrôle ne s'effectue que sur les matières premières et les préparations officinales et/ou magistrales. Il ne porte que sur l'identification.

Les formes pharmaceutiques préparées à l'avance : spécialités médicaments préfabriqués, prémélanges pour aliments médicamenteux ne font l'objet d'aucun contrôle.

Pour effectuer cette identification réglementaire, le pharmacien d'officine et le vétérinaire praticien disposent des Pharmacopées et du Formulaire National (Français).

Le contrôle de la qualité n'est pas obligatoire. Le fabriquant communique au pharmacien ou au vétérinaire les résultats obtenus lors de son contrôle.

III. LES OPÉRATIONS DE CONTRÔLE SELON LA PHARMACOPÉE

De nombreuses matières premières sont traitées dans la Pharmacopée Européenne et le Formulaire National Français.

La Pharmacopée européenne (Ph. Eur.) définit les exigences relatives à la composition qualitative et quantitative des médicaments, les essais à effectuer sur les médicaments et sur les substances et matériaux utilisés pour leur fabrication.
Elle couvre les substances actives, les excipients et les préparations d'origine chimique, animale, humaine ou végétale, les préparations homéopathiques et les souches homéopathiques, les antibiotiques, ainsi que les formes pharmaceutiques et les récipients. Elle comprend également des textes portant sur des produits biologiques, des dérivés du sang et du plasma, des vaccins et des préparations radio-pharmaceutiques.

La Pharmacopée européenne et ses exigences sont juridiquement contraignantes dans les États signataires (dont la Tunisie) de la Convention relative à l'élaboration d'une Pharmacopée européenne et les États membres de l'Union européenne.

Sont inscrits à la Pharmacopée, des produits d'un assez large emploi, dont la fabrication est réalisée par plusieurs industriels et dont on veut garantir une qualité homogène.

Aucun chapitre n'est consacré aux médicaments préparés à l'avance (spécialités pharmaceutiques).

Chaque monographie est présentée selon le plan suivant :

- Nom du principe actif, dénomination commune ;
- Formule brute et développée ;
- Définition qualitative du produit officinal exprimée par les valeurs limites de son degré de pureté, de son titre, de son activité ;
- Caractères ;
- Identification ;
- Essai ;
- Incompatibilités ;
- Précautions à prendre pour la conservation ;
- Mode d'emploi qui se limite à l'énumération des formes pharmaceutiques officinales que l'on peut préparer avec la matière première considérée ;
- Inscription éventuelle à un tableau de substances vénéneuses.

Les rubriques à contrôler d'une manière pratique sont : les Caractères, l'Identification, l'Essai et le Dosage sur lesquelles quelques précisions vont être données.

- **Caractères**

Les caractères à vérifier selon la Pharmacopée sont les suivants :

- Aspect

Pour les liquides, on note leur mobilité, leur consistance, leur viscosité. Pour les solides, on note leur forme cristalline ou amorphe. Pour les plantes officinales, l'observation porte sur leur morphologie. Elle peut être complétée éventuellement par un examen microscopique.

- Couleur

Les composés organiques se présentent le plus souvent sous forme de " poudres blanches ou incolores". L'observation de la couleur peut indiquer sur une altération (coloration rosée des produits phénoliques).

- Odeur

L'odeur permet de reconnaître certaines essences, certains solvants. Elle permet en outre de détecter des altérations ou des contaminations.

- Saveur

La saveur est souvent signalée par la Pharmacopée. Cependant il ne faut jamais goûter une substance qui n'a pas été identifiée d'une façon certaine. Apprécier une saveur peut exposer à des accidents lorsqu'il s'agit de substances toxiques.

- Solubilité : dans l'eau et les solvants organiques.

L'appréciation de l'hydrosolubilité ou de la solubilité dans certains solvants organiques, permet de distinguer des acides ou des bases de leurs sels tels que barbiturique/barbiturate alcalin ; alcaloïde/chlorhydrate d'alcaloïde, les premiers étant solubles dans les solvants organiques, alors que les sels ne le sont pas et inversement sont solubles dans l'eau.

L'examen des caractères doit toujours être effectué, mais il ne permet jamais de conclure. Les caractères ne constituent pas une preuve certaine de reconnaissance d'un produit.

- **Identification**

L'identification est basée soit sur la détermination d'indices physiques faciles à réaliser pour la plupart (point de fusion instantané, pouvoir rotatoire spécifique, spectre d'absorption moléculaire dans l'infrarouge ou l'UV.) ou sur la mise en évidence d'un ou plusieurs groupements

chimiques de la molécule (fonction amine, fonction phénol…etc.) par une ou plusieurs réactions colorimétriques.

On ne peut conclure à l'identité du composé que si toutes les réactions mises en œuvre se révèlent positives !

- **Essai**

L'essai a pour objet d'une part l'évaluation semi-quantitative des impuretés et d'autre part la détermination par dosage soit du degré de pureté pour les solides, soit de la dilution pour les liquides.

La recherche de certaines impuretés (chlorures, sulfates, métaux lourds) font appel à des réactions de précipitation en solution aqueuse.

L'essai est comparatif : on compare par exemple l'opalescence d'un tube dit "essai" par rapport à l'opalescence d'un tube "témoin" contenant une teneur limite d'impuretés fixées par la Pharmacopée.

Pour que la teneur en impuretés du médicament soit inférieure à la norme permise, il faut que l'opalescence du tube "essai" soit inférieure à l'opalescence du tube "témoin".

Si ces réactions ne sont pas vérifiées, le produit est déclaré non officinal et refusé.

- **Le Dosage**

Le dosage est réalisé le plus souvent sur des matières premières solides, il s'effectue sur une prise d'essai p du produit brut. Le dosage permet de déterminer la quantité p' de principe actif, chimiquement pur, présent dans cette prise d'essai. Le degré de pureté est exprimé alors en pourcentage par le rapport $p' / p \times 100$.

Pour être officinal, un produit doit présenter un titre compris dans une fourchette de valeurs indiquée dans la monographie, tenant compte d'une part des tolérances en matière d'impuretés et d'autre part des imprécisions de mesure inhérentes à la méthode décrite.

La borne supérieure de la marge de tolérance peut atteindre une valeur dépassant 100, ce qui ne correspond à aucune réalité physique. Cependant pour que le chiffre obtenu soit significatif, il faut que le matériel utilisé soit suffisamment précis (la précision soit suffisante). La Pharmacopée a prévu une convention, la détermination n'est jugée acceptable que si l'erreur est au plus égale à la moitié de l'écart de tolérance fixé par la Pharmacopée.

Si toutes ces conditions sont réunies, on pourra alors dire que le degré de pureté est satisfaisant.

Exemple :

Pour le barbital sodique par exemple le pourcentage de substance pure dans le produit contrôlé doit être compris entre *98,5 % et 101,0 %* selon la Pharmacopée. Le résultat du dosage est conforme si le résultat brut obtenu se situe dans la fourchette, sans tenir compte de l'erreur relative de la mesure.

Cette méthode de raisonnement surprendra ceux qui ont l'habitude de faire suivre un résultat d'analyse statistique de son incertitude c'est-à-dire d'indiquer après avoir fait le dosage, la précision du résultat.

La Pharmacopée demande à l'opérateur de s'assurer avant de faire le dosage que le matériel, dont il dispose lui permet de travailler avec une précision suffisante. Dans le cas du barbital sodique, il est évident que si le matériel permet d'obtenir un résultat avec une incertitude inférieure ou égale à 1 %, la condition de la pharmacopée est remplie, puisque la borne supérieure est 101,0 pour cent. Si le matériel disponible ne permet pas d'avoir cette précision, il convient de le remplacer par du matériel plus performant, c'est-à-dire dans la pratique d'utiliser des burettes et des pipettes permettant une détermination plus précise des volumes mis en jeu.

En résumé, pour faire des dosages selon les exigences de la pharmacopée, Il faut dans un premier temps s'assurer que le matériel dont on dispose est suffisamment précis. Ensuite l'interprétation du résultat est simple.

Il est évident que quelque soit le résultat, il est recommandé de recommencer le dosage (2 ou 3 fois) et de faire ensuite la moyenne des différents résultats obtenus.

Chapitre 3

PRINCIPES DE QUELQUES RÉACTIONS ANALYTIQUES COURANTES

La connaissance de ces principes est indispensable pour la compréhension de toutes les séances de TP, ceux-ci feront l'objet d'une interrogation à chaque début de séance.

Nous exposerons ci après les principes des réactions couramment utilisées par la Pharmacopée soit pour mettre eu évidence des impuretés minérales dans le cadre des- "essais" soit pour identifier des groupements ou des familles chimiques dans le cadre des "identifications". Ceci nous conduit à étudier successivement d'une part les anions et les cations, d'autre part des groupements chimiques divers.

La plupart de ces réactions se déroulent en milieu aqueux sur les substances en solution, nous ferons en préambule un rappel des principes de solubilisation particulièrement pour les sels minéraux puisque la mise en évidence de nombreux anions ou cations met en jeu ces phénomènes.

I. SOLUBILISATION

Le passage en solution d'un solide dans un liquide implique la mise en jeu d'une énergie de solvatation. Celle-ci à température constante est fournie par les interactions qui s'exercent entre les molécules du solide et celles du solvant et plus précisément par l'énergie libérée lorsque les molécules du solvant attirées par celles du soluté s'en approchent et se répartissent autour d'elles comme un véritable nuage. Plus cette énergie est élevée, plus la solubilisation sera aisée.

- **Solubilisation des sels minéraux**

A l'état solide les sels minéraux sont dans un état stable cristallin, d'énergie minimum, où s'équilibrent les forces attractives Coulombiennes des ions et des forces répulsives des masses. A cet état d'équilibre correspond une distance séparant les ions de charge opposée : la distance réticulaire "ao".

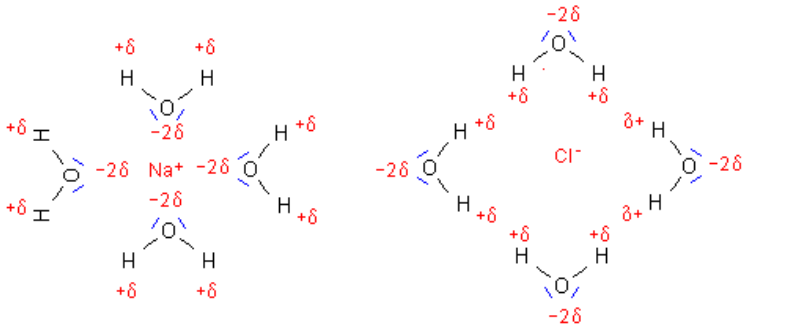
Solubiliser un tel composé, c'est séparer ses ions et donc fournir une énergie de dissociation pour les porter de la distance "ao" à l'infini.

Les molécules d'eau, polaires, exercent sur le cristal des forces électriques qui dissocient le cristal ionique. Les deux étapes : dissociation du cristal en

ions séparés et solvatation des ions, sont suivies de la dispersion des ions solvatés dans tout le volume occupé par le liquide.

Le phénomène de solvatation des ions, dû à l'interaction ion-dipôle, est général et d'autant plus accentué que l'ion est petit et que sa charge est élevée.

L'atome d'hydrogène H est formé d'un noyau (ne comportant qu'un seul proton positif) et d'un électron négatif. L'ion H^+ est donc un proton. Cet ion est très petit. Il forme avec l'eau une liaison très forte qui permet de considérer l'ion H^+ (aq) comme l'espèce $H3O^+$, appelée ion oxonium (plutôt que hydronium). Cet ion $H3O^+$, présent dans une solution aqueuse, lui confère des propriétés acides.



δ représente une charge partielle positive inférieure à la charge élémentaire e = 1,6 × 10 -19 C.
- δ représente une charge négative, de même valeur absolue.
En réalité, l'orientation des molécules d'eau polaires se fait dans l'espace à trois dimensions.

NB : Dans la série des sulfates $CaSO_4$, $BaSO_4$ la solubilité diminue de calcium au baryum, la charge du cation restant +2 mais les molécules d'eau s'approchent bien moins du centre de charge de l'ion Ba^{2+} que l'ion Ca^{2+}.

En conséquence lorsque l'on veut caractériser, ou même doser, un ion dans un milieu, il sera possible, en opérant en solution à l'aide d'un ion de charge opposée (convenablement choisi) de le faire apparaître sous forme d'un complexe peu soluble, qui précipitera.

Il faut noter enfin qu'un composé insoluble neutre peut à nouveau être solubilisé s'il acquiert une charge, par exemple par formation de complexe supérieur.

Exemple :

$$\underset{\text{(Insoluble)}}{I_2 + I^-} \rightleftharpoons \underset{\text{(Hydrosoluble)}}{I_3^-}$$

- **Solubilisation des molécules organiques**

Leur cas doit être envisagé différemment selon qu'elles portent ou non des groupements ionisés ou ionisables et que l'influence de ces groupements prédomine ou non les effets hydrophobes des structures hydrocarbonées.

Les alcools, les amines ou les thiols de faible poids moléculaire (PM) sont généralement hydrosolubles car les effets de la fraction hydrophobe de leur molécule sont compensés par les interactions s'établissant entre molécules d'eau et fonctions polaires. La présence de multiples fonctions notamment alcool au sein d'une structure de PM assez élevé est souvent (mais pas toujours, ex : tétracyclines liposolubles) responsable de son hydrosolubilité (exemple : des polyols de haut poids moléculaire).

Les acides organiques (moyennement forts et faibles) de PM peu important sont hydrosolubles, l'énergie de solvation des ions formés par dissociation de la fonction acide carboxylique étant suffisamment élevée. Alors que les acides organiques de PM élevé sont liposolubles, le caractère hydrophobe de la chaîne hydrocarbonée devenant trop important et la dissociation acide trop faible.

Le même raisonnement peut s'appliquer aux bases organiques aminées.

Par contre les sels obtenues à partir des acides organiques, carboxyliques ou non (barbituriques, sulfamides,...) par action de bases minérales (notamment la soude) seront hydrosolubles car fortement dissociés en ions. Aussi trouve-t-on couramment en pharmacie ces sels alcalins d'acides organiques qui permettent la préparation de solutés injectables.

Avec les bases organiques azotées ce sont généralement des sels préparés avec des acides minéraux que l'on préparera tels des chlorhydrates, des sulfates, des phosphates…etc. Sels qui sont fortement dissociés en milieu aqueux et permettent donc l'obtention de solutés injectables.

Les composés totalement apolaires (non ionisables) ne pourront être solubilisés que par des solvants dont les molécules ont elles-mêmes un caractère hydrophobe avec qui s'exerceront des interactions de type hydrophobe. Ces solvants apolaires organiques sont représentés par les hydrocarbures liquides (hexane, heptane, toluène), des hydrocarbures halogénés (CH_2Cl_2, CCl_4, fréons....).

Entre l'eau solvant polaire et ces derniers solvants se situent des solvants de polarité intermédiaire tels que les alcools, l'éther, l'acétone....

II. REACTIONS ANALYTIQUES DES IONS

Ces réactions sont fréquemment des réactions de précipitation, nous ne décrirons que les réactions mises en œuvre dans les travaux pratiques.

1. Chlorures (Cl^-)

2 réactions sont utilisées :

a. Précipitation sous forme de chlorure d'argent blanc en milieu acide (HNO_3) les ions Ag^+ sont supportés par une solution d'$AgNO_3$.

$$Cl^- + Ag^+ \longleftrightarrow AgCl\downarrow$$

En milieu ammoniacal on observe une redissolution, car les molécules polaires d'ammoniac viennent complexer Ag^+ et dissocient le sel Ag Cl.

Selon :

$$AgCl\downarrow \longleftrightarrow Cl^- + Ag^+ + NH_3 \longleftrightarrow (Ag\ NH_3)_2 + Cl^-$$

Si on ré-acidifie le milieu, l'ammoniac neutralisé libère Ag^+ et il y a reformation de chlorure d'argent.

Cette réaction de précipitation est utilisable quantitativement pour <u>l'essai limite des chlorures</u> dans un médicament.

On opère dans 2 tubes à essais de façon comparative (mêmes conditions de volumes de solution et de concentration en ions Ag^+)
Dans le premier, le <u>tube témoin</u>, contenant des ions Ag^+, on place la quantité limite d'ions Cl^- acceptable dans un poids donné de médicament, on obtient l'(Opalescence T).

Dans le deuxième tube, le <u>tube essai</u> contenant la même concentration d'ions Ag^+. On place le médicament (ou son équivalent sous forme de solution, on obtient l'(Opalescence E).

Si $O_E > O_T$ la teneur en Cl^- du tube essai dépasse la norme permise
Si $O_E < O_T$ la teneur en Cl^- du tube essai est dans la norme permise

b. Oxydation des chlorures en chlore gazeux par un oxydant puissant l'ion permanganate en milieu acide et à chaud

$$5\ [\ 2\ Cl^- \longrightarrow Cl_2 + 2e^-\ ]$$
$$2\ [\ MnO_4 + 8H^+ + 5e^- \longrightarrow Mn^{2+} + 4H_2O\ ]$$

Le chlore produit peut ensuite en se dégageant oxyder à son tour des iodures en iode

$$Cl_2 + 2\ e^- \longrightarrow 2\ Cl^-$$
$$2\ I^- \longrightarrow I_2 + 2e^-$$

L'iode formé est caractérisé par l'amidon ⟶ coloration bleue.

2. Iodures (I^-)

2 réactions sont prévues :

a. Précipitation sous forme d'iodure d'argent jaune pâle, les ions argent étant apportés par une solution de nitrate d'argent.

$$I^- + Ag^+ \longrightarrow \underline{AgI}\downarrow$$

L'addition d'ammoniac ne permet pas ici de dissocier suffisamment le sel formé qui ne peut dons pas se redissoudre.

b. Oxydation des iodures en iode par le bichromate de potassium en milieu acide

$$3\ [\ 2\ I^- \longrightarrow I_2 + 2e^-\ ]$$
$$Cr_2O_7^- + 14H^+ + 6e^- \longrightarrow 2\ Cr^{3+} + 7H_2O$$

L'iode ainsi formé est extrait par le chloroforme ($CHCl_3$), son passage dans cette phase organique s'accompagne d'une coloration violette (NB : cette extraction nécessite une bonne agitation).

3. Sulfates (SO_4^{2-})

Une seule réaction est utilisée :

- **Précipitation sous forme de sulfate de baryum blanc insoluble en milieu alcalin : l'ion baryum est apporté sous forme d'une solution de chlorure de baryum.**

$$SO_4^{2-} + Ba^{2+} \longrightarrow BaSO_4 \downarrow$$

Cette réaction est utilisable quantitativement pour l'essai limite des sulfates dans un médicament, elle est rendue plus sensible en opérant en présence d'alcool qui diminue la solubilité de $BaSO_4$.

On réalise dans les mêmes conditions de volume et de concentration en ions Ba^{2+} dans deux tubes à essai. Dans le premier tube, le tube témoin, contenant des ions Ba^{2+} on place la quantité limite d'ions $SO4^{--}$ acceptable dans un poids donné du médicament on obtient l'(Opalescence T).

.

Dans le deuxième tube, le tube essai, contenant la même concentration, d'ions Ba^{2+} on place le poids du médicament (ou son équivalent sous forme de solution), on obtient l'(Opalescence E).

Si $O_E > O_T$ la teneur en SO_4^{2-} du tube essai dépasse la norme permise Si $O_E < O_T$ la teneur en SO_4^{2-} du tube essai est dans la norme permise

4. Phosphates (ortho) (PO_4^{3-})

2 réactions sont prévues **:**

a. Précipitation sous forme de phosphate d'argent

L'apport des ions argent se fait par une solution de nitrate d'argent.

$$PO_4^{3-} + 3\,Ag \longrightarrow Ag_3(PO_4) \downarrow$$

Le sel formé peut être redissous :

- Soit par acidification du milieu qui diminue la concentration des ions PO_4^{3-} libres.

$$PO_4^{3-} + H^+ \longrightarrow H\,PO_4^{2-} + H^+ \longrightarrow H_2\,PO_4^-$$

- Soit par addition d'ammoniac qui complexe les ions Ag^+ et diminue également leur concentration dans le milieu.

b. Précipitation sous forme de phospho-molybdate d'ammonium

Elle se fait par addition de molybdate d'ammonium en milieu acide (nitrique) et à chaud.
Le précipité obtenu est jaune, il est décomposé en milieu alcalin (par dissociation), sa composition théorique est $(NH_4)\,3[P\,Mo_{12}\,O_{10}]$.

5. Sodium (Na^+)

3 réactions sont utilisées :

a. Excitation des électrons périphériques du sodium par la chaleur

Cette excitation est suivie de leur retour à l'équilibre avec émission de photons lumineux qui colorent en jaune une flamme vive initialement incolore.

b. Précipitation sous forme de pyro-antimoniate de sodium

Par addition de pyro-antimoniate de potassium. Réaction lente nécessitant des réactifs en solution concentrée.

c. Précipitation sous forme d'acétate triple d'uranyle de magnésium et de sodium (de couleur jaune)

$$CH_3COONa - (CH_3COO)_2Mg - [(CH3COO)_2UO_2]_3 \downarrow$$

6. Métaux lourds (Pb, Hg, Cu)

Une réaction est utilisée :

Précipitation sous forme de sulfures, ± bruns, insolubles en milieu acide : les ions sulfures sont apportés par la thio-acétamide en solution et le pH fixé à 3,5 par un mélange tampon.

$$M^{2+} + S^{2-} \longrightarrow MS \downarrow \quad (M = métal)$$

Cette réaction est utilisée surtout pour l'essai limite des métaux lourds en opérant de manière comparative (mêmes conditions de volume et de concentrations en ions S^{2-}) dans deux tubes à essais.

Dans le premier tube, le tube témoin, contenant les ions S^{2-} on place la quantité limite de métaux lourds acceptables dans un poids donné de médicament sous forme d'un soluté à 1 ou 2 ppm d'ions Pb^{2+} on obtient une teinte brune T.
Dans le 2ème tube, le tube essai, contenant la même concentration d'ions S^{2-} on place le poids de médicament à tester (ou équivalent sous forme soluté), on obtient une teinte E.

Si E > T la teneur en métaux lourds de l'essai dépasse la norme admise Si E < T la teneur en métaux lourds de l'essai est dans la norme admise.

Ce mode de détermination confond l'ensemble des métaux lourds ce qui est justifié dans la mesure ou leur toxicité est assez voisine et ou leurs sulfures sont assez identiquement insolubles et colorés.

III. REACTIONS ANALYTIQUES DE GROUPE

1. Amines primaires aromatiques

Il s'agit ici des arylamines, c'est à dire, des molécules organiques portant une fonction amine primaire directement fixée sur un noyau aromatique.

Nous les schématiserons par $R\text{-}NH_2$.

2 réactions sont employées à la pharmacopée pour les caractériser :

a. Condensation avec le diméthyl-amino-benzaldéhyde

Formation d'un dérivé coloré en jaune orangé.

b. Diazotation suivie d'une condensation avec un phénol

Formation d'ion azoïque fortement coloré en rouge orangé.

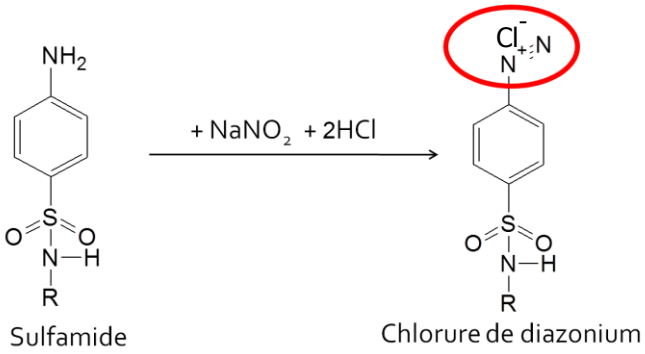
La diazotation est réalisée par condensation avec l'acide nitreux obtenu extemporanément par cation de HCl sur une solution de nitrite de soude.

On obtient d'abord un diazoïque qui se stabilise en milieu HCl, sous forme d'un chlorure de diazonium.

$$-N{=}N\text{-}OH + HCl \longrightarrow {=}N^{+}\text{-}N + Cl^{-}$$

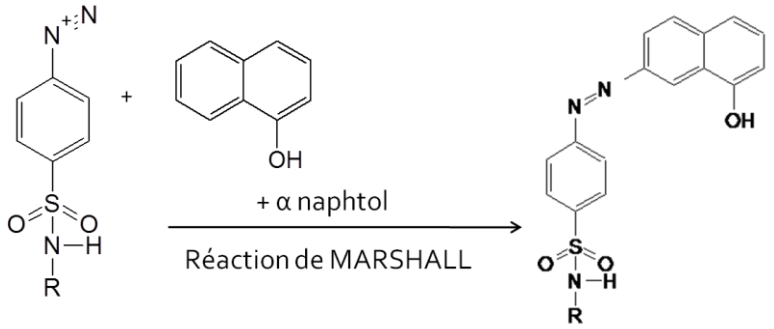
Le milieu chlorhydrique est par ailleurs nécessaire initialement à la solubilisation de l'amine aromatique.

Exemple : Diazocopulation des sulfonamides antibactériens :



Sulfamide — Chlorure de diazonium

La copulation du diazoïque est réalisée avec un phénol (α naphtol) pour donner un hydroxy-azoïque coloré.



Coloration rouge orange

2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, de structure généralement hétérocyclique, comportant dans leur molécule un ou plusieurs atomes d'azote leur conférant un caractère basique (alcalin d'où alcaloïde).
Bien que très variés sur le plan structural et sur le plan activité pharmacologique, ces composés présentent sur le plan analytique des propriétés communes : celles de précipiter en présence de divers réactifs appelés pour cette raison « **réactifs généraux de précipitation des alcaloïdes** ».
Les plus importants d'entre eux sont à base d'iode ; celui utilisé dans la Pharmacopée est l'iodo-bismuthate de potassium (réactif de *Dragendorff*) qui donne avec tous les alcaloïdes un précipité rouge orangé .
Ces réactions de précipitation sont réalisées en milieu aqueux ou les alcaloïdes ne sont généralement pas solubles. Pour cette raison, l'acidification du milieu est nécessaire et permet de les faire passer à l'état de sel hydrosoluble.
La sensibilité et la généralité de ce genre de réactions, positives avec d'autres molécules organiques azotées de synthèse, ne permet pas d'affirmer en présence de réaction qu'un alcaloïde, est bien présent. A ce stade là, il convient de poursuivre les épreuves d'identification par les réactions de coloration spécifiques.

Exemple :

3 réactions de coloration spécifiques sont nécessaires pour l'identification de la strychnine :

- Réaction au tétra-hydro-strychnine
- Réaction au bichromate de potassium
- Réaction de MANDELIN

DEUXIEME PARTIE

MANIPULATIONS
DE PHARMACIE & TOXICOLOGIE

MANIPULATIONS DE PHARMACIE

CONTRÔLE OFFICINAL D'UNE SOLUTION DE PEROXYDE D'HYDROGENE A 3%

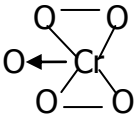
(Eau oxygénée à 3% officinale)

I. PROPRIETES GENERALES - PHARMACIE CHIMIQUE

L'eau oxygénée est un soluté aqueux de peroxyde d'hydrogène. Elle est utilisée en thérapeutique principalement comme antiseptique, hémostatique et vomitif chez les carnivores domestiques dans le cadre du traitement d'urgence des intoxications.

La molécule de peroxyde d'hydrogène **H_2O_2** est caractérisée par le groupement dioxygène **O-O** responsable du caractère oxydant marqué de l'eau oxygénée.
Le groupement dioxygène présente la propriété de pouvoir être transféré sur les atomes métalliques. C'est ainsi qu'en faisant réagir l'eau oxygénée sur du chromate de potassium (K_2CrO_4) en milieu acide, il se forme du peroxyde de chrome CrO_5

$$(2K^+ CrO_4^{--}) + 2\ H\text{-}O\text{-}O\text{-}H + 2\ H^+ \longrightarrow$$



$$+ 3\ H_2O$$

Le peroxyde de chrome est très soluble dans l'éther qui peut ainsi l'extraire de l'eau et le concentrer dans ce milieu organique qui devient alors fortement coloré en bleu.

La liaison **H-O-** est par ailleurs relativement labile si bien que les solutés de peroxyde d'hydrogène ont un pH légèrement acide.

L'eau oxygénée libère spontanément de l'oxygène par décomposition de $H_2\ O_2$ selon la réaction :

$$H_2O_2 \longrightarrow H_2O + \tfrac{1}{2}\ O_2\uparrow$$

1 mole	½ mole
34, 02g	11,2 L

Cette décomposition est beaucoup plus rapide en présence d'un oxydant puissant (le permanganate de potassium $KMnO_4$) et en milieu alcalin.

Un soluté d'eau oxygénée contenant 1 mole/litre, c'est à dire ayant une concentration de 3,4% est désigné par convention comme étant à 11,2 volumes.

> *« Le volume d'une eau oxygénée est défini par le nombre de volumes d'oxygène, libérés par 1 volume (avec les mêmes unités de mesure) de solution, ou encore par le nombre de litres d'oxygènes que peut libérer un litre de solution ».*

Exemple : 1 litre d'eau oxygène 10 volumes, libère donc 10 litres d'oxygène.

Dans la molécule H_2O_2, l'oxygène est à l'état d'oxydation -1, il peut donc être soit oxydant soit réducteur selon le système redox avec lequel il est couplé.

Comme oxydant, c'est le système suivant qui intervient :

$$H_2O_2 + 2e^- \longrightarrow 2\ H_2O$$

Comme réducteur, c'est le système suivant qui entre en jeu :

$$H_2O_2 \longrightarrow 2H^+ + 2e^- + O_2$$

C'est le cas rencontré lorsque l'on met en présence l'eau oxygénée et le permanganate de potassium en milieu acide ,réaction utilisable pour le dosage de l'eau oxygénée .on a alors les équations suivantes :

$$5\ [H_2O_2^{\mathbf{-1}} \longrightarrow 2H^{\mathbf{+}} + 2e^{\mathbf{-}} + O^{\mathbf{0}}_2]$$
$$2\ [Mn^{\mathbf{+VII}}O_4^{\mathbf{-}} + 8H^{\mathbf{+}} + 5e^{\mathbf{-}} \longrightarrow Mn^{\mathbf{+II}} + 4\ H_2O]$$
$$5\ H_2O_2 + 2\ MnO_4^- + 6\ H^+ \longrightarrow 2\ Mn^{++} + 8H_2O + 5O_2$$

L'ion permanganate MnO_4^- en milieu acide oxyde le peroxyde d'hydrogène H_2O_2.

Simultanément, l'ion permanganate MnO_4^- coloré en violet est réduit à l'état d'ion manganeux Mn^{++} incolore.

Lorsque tout H_2O_2 est oxydé, les ions MnO_4^- en excès colorent le milieu en rose, indiquant alors que le point d'équivalence est atteint.

⚠ Il faut toujours opérer en milieu acide (en présence de H_2SO_4), sinon $KMnO_4$ va passer sous forme de MnO_2, précipité gris qui ne permet pas de voir le virage.

La correspondance de la pharmacopée est obtenue par le raisonnement suivant : une solution normale de peroxyde d'hydrogène correspond à ½ mole (car il ya libération de 2 électrons), ce qui équivaut à 17,01 grammes de H_2O_2 (car 1 mole correspond à 34,02 g).

- 1 litre d'une solution normale (1N) de $KMnO_4$ réagit sur 1 litre d'une solution normale de peroxyde d'hydrogène H_2O_2
- 1 litre d'une solution 1N de $KMnO_4$ oxyde 17,01 g de H_2O_2
- 1ml d'une solution 1N de $KMnO_4$ oxyde 17,01 mg de H_2O_2
- 1ml d'une solution 0,1N de $KMnO_4$ oxyde 1,701 mg de H_2O_2

Soit n le nombre de millilitres nécessaires au titrage :
n ml d'une solution 0,1N de $KMnO_4$ correspond à n . 1,701 mg de H_2O_2 contenue dans le volume de la prise d'essai du dosage, c'est-à-dire 1000 mg.

$$\mathbf{H_2O_2\ \%} = n \mathbf{.\ 1{,}701\ .\ 100/1000}$$

Le calculer du volume de l'eau oxygénée se fait en sachant qu'une solution à 3,402 % correspond à 11.2 volumes.

3,4 %	→	**11,2 Volumes**
H_2O_2 %	→	**X Volumes ?**

Ici le dosage n'est pas destiné à vérifier la pureté, mais permet de calculer le titre de la solution et de l'identifier. Un soluté de peroxyde d'hydrogène ne peut être dénommé « eau oxygénée » que si sa concentration en peroxyde d'hydrogène est comprise entre 2,5 % et 3,5 %.

II. MANIPULATION

1. MATERIEL ET REACTIFS

- **Matériel (par binome)** :

- Béchers de 100 ml
- Erlenmeyers
- Fiole jaugée de 100 ml
- Tubes à essais (portoir)
- Eprouvette graduée de 35 ml
- Pipettes
- Burette + support
- Carré carton noir

- **Réactifs communs (par paillasse) :**
  - Acide sulfurique concentré
  - Acide sulfurique dilué
  - Ether
  - Solution de chromate de potassium
  - Solution de rouge de méthyle
  - Hydroxyde de sodium 0,1N
  - Permanganate de potassium 0,1N.

2. Opérations à réaliser pendant la séance de TP.

On vous demande de contrôler l'identité puis la pureté de la solution qui est mise à votre disposition dans le « Falcon identifié : eau oxygénée »

Vous limiterez votre travail à la réalisation des épreuves suivantes :

- **Identifications : A - B - C**
- **Essai acidité**
- **Dosage**

3. Instructions de manipulation

- **Identifications** : à effectuer dans les tubes à essai.

Identification B :

A réaliser avec précaution en manipulant à l'écart de tout foyer incandescent **l'éther est inflammable** et ses vapeurs forment avec l'air un mélange explosif.
Agitez violemment pour extraire le dérivé perchromique et laisser décanter pour observer la phase éthéré colorée en bleue.
Eliminer le contenu de ce tube dans le récipient spécialement prévu pour cent usage.

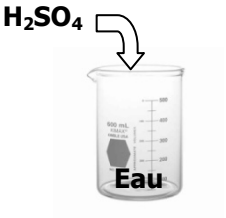
- **Essai acidité**

Opérer dans un bécher de 100 ml, mesurer les volumes à l'éprouvette graduée. Pour évaluer le volume de soude (NaOH) nécessaire au virage on utilise le tube compte gouttes en comptant 1 goutte : 0,05 ml.

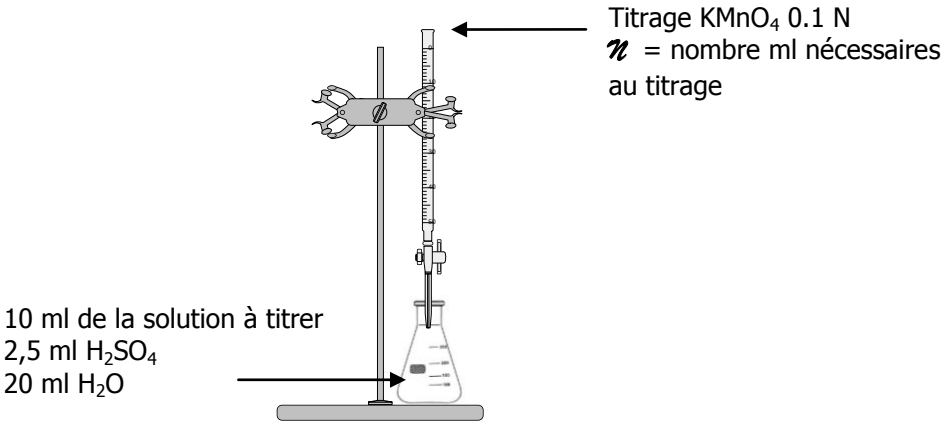
- **Dosage**

Le dosage est réalisé sur une solution contenant une quantité voisine de 10 g pour 100ml de l'eau oxygénée à contrôler, exactement pesée et dont le poids est indiqué sur le flacon.
Prélever avec une pipette les 100 ml nécessaires au titrage, les porter dans un erlenmeyer où a été préparé un mélange H_2O - H_2SO_4 en versant avec précaution 2,5 ml de H_2SO_4 dans 20 ml d'eau, en maintenant le fond

de l'erlenmeyer immergé dans l'eau froide pour éviter une réaction trop exothermique.



⚠ Effectuer au moins 2 titrages sur 2 prélèvements de 10 ml.



NB : la persistance d'une coloration violacée dans la solution à titrer indique que le point d'équivalence a été atteint.

4. Compte rendu

Sur une feuille de compte rendu vierge, qui vous est remise, indiquez pour chaque épreuve réalisée :

- Vos observations, les résultats analytiques ainsi que les interprétations que vous en faites,
- La conclusion générale de votre contrôle officinal.

HYDROGENE (PEROXYDE D') SOLUTION A 3 POUR CENT

Hydrogenii peroxidum 3 per centum

DEFINITION

Teneur : 2,5 pour cent m/m à 3,5 pour cent m/m de H_2O_2 (M_r 34,01).

1 volume de solution de peroxyde d'hydrogène à 3 pour cent correspond à environ 10 fois son volume d'oxygène. Cette solution peut être additionnée d'un stabilisant approprié.

CARACTERES

Aspect : liquide incolore, limpide.

IDENTIFICATION

A. A 2 ml de solution à examiner, ajoutez 0,2 ml d'acide sulfurique dilué R et 0,2 ml de permanganate de potassium 0,1 N. Dans les 2 minutes la solution devient incolore ou légèrement rose.

B. A 0,5 ml de solution à examiner, ajoutez 1 ml d'acide sulfurique dilué R, 2 ml d'éther R et 0,1 ml de solution de chromate de potassium R, puis agitez. La couche éthérée est bleue.

C. La solution à examiner satisfait à l'exigence de teneur en H_2O_2.

ESSAI

Acidité. A 10 ml de solution à examiner, ajoutez 10 ml d'eau R et 0,25 ml de solution de rouge de méthyle R Le virage de l'indicateur ne nécessite pas moins de 0,1 ml et pas plus de 1 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 N..

Stabilisants organiques : au maximum 50 ppm

Agitez 20 ml de solution à examiner avec 10 ml de chloroforme R, puis avec 2 fois 5 ml de chloroforme R. Réunissez les couches chloroformiques et évaporez-les sous pression réduite à une température qui ne dépasse pas 25 °C, puis desséchez au dessiccateur. La masse du résidu est au maximum de 10 mg.

Résidu non volatil : au maximum 0,2 g/l

Dans une capsule de platine, laissez reposer jusqu'à cessation de toute effervescence 10 ml de solution à examiner en refroidissant si nécessaire. Evaporez ensuite au bain-marie à siccité, puis desséchez à 100 – 105 °C. La masse du résidu est au maximum de 20 mg

DOSAGE

Dans un ballon jaugé introduisez une prise d'essai exactement pesée voisine de 10g et complétez à 100 ml avec de l'eau. Prélevez 10 ml de la solution et ajoutez-les à un mélange refroidi de 2,5 ml d'acide sulfurique R et de 20 ml d'eau. Titrez par le permanganate de potassium 0,1 N jusqu'à coloration rose.

1 ml de permanganate de potassium 0,1 N correspond à 1,701 mg de H_2O_2.

CONSERVATION

A l'abri de la lumière, si la solution ne contient pas de stabilisant, à une température inférieure à 15° C.

ETIQUETAGE

Si la solution de peroxyde d'hydrogène à 3 pour cent contient un stabilisant, l'étiquette porte la mention « stabilisée ». L'Autorité compétente peut exiger que le nom de tout stabilisant ajouté soit indiqué sur l'étiquette.

OBSERVATION

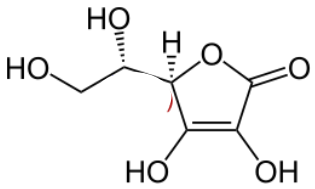
La solution de peroxyde d'hydrogène à 3 pour cent se décompose énergiquement au contact des matières organiques oxydables, de certains métaux et en milieu alcalin.

CONTRÔLE OFFICINAL DE L'ACIDE ASCORBIQUE

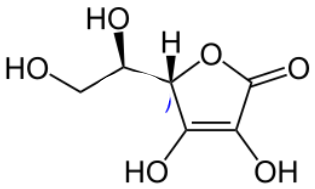
I. PROPRIETES GENERALES - PHARMACIE CHIMIQUE

L'acide ascorbique est un composé organique naturel exerçant une activité vitaminique C.
Structuralement, l'acide ascorbique est proche des sucres à 6 atomes de carbone, il est caractérisé par un cycle lactone (furanique insaturé) présentant un système de doubles liaisons conjuguées, ce qui confère à la molécule une absorption dans le domaine de l'UV et du visible proche de l'UV.
Il possède deux atomes de carbone asymétriques sur la chaîne carbonée latérale. Il se présente sous la forme de deux paires d'énantiomères (une paire est connue sous le nom d'acide ascorbique et l'autre d'acide isoascorbique).

Les deux énantiomères de l'acide ascorbique sont : l'acide L ascorbique et l'acide D ascorbique.



Acide L ascorbique



Acide D ascorbique

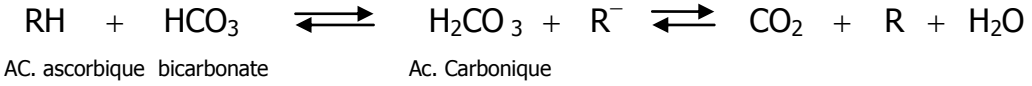
Seule la forme acide L ascorbique est active. Par conséquent, l'activité vitaminique C est exprimée en mg d'acide L ascorbique.

L'acide L ascorbique a une action sur la lumière polarisée. Il est doué d'une activité optique dextrogyre.

L'acide L-ascorbique se présente sous forme de cristaux blancs, solubles dans l'eau et l'alcool, insolubles dans les solvants organiques.

I est sensible à la lumière, l'air (oxygène), la chaleur et les métaux.

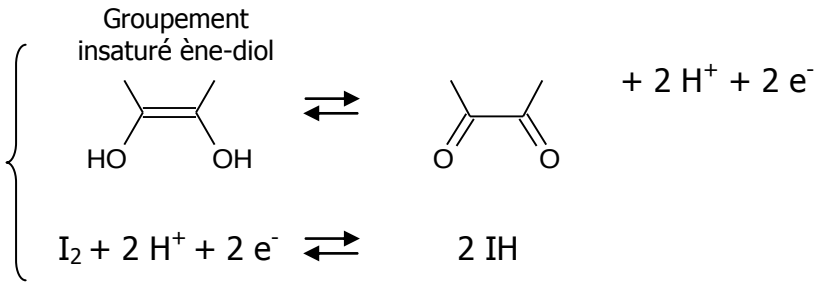
L'acide ascorbique est un diacide (pK_a de 4,1 et 11,8). Dans l'organisme, il se comporte comme un monoacide (-RH), propriété qui est due principalement à la mobilité des protons H^+ portés par les -OH fixés sur le cycle insaturé ; c'est un acide plus fort que l'acide carbonique qu'il déplace de ses sels, selon la réaction :



C'est aussi un composé réducteur, propriété due à son groupement insaturé ène-diol, ceci peut être mis en évidence par la réduction à froid de $AgNO_3$ en Ag.

Cette propriété réductrice permet le dosage chimique, iodométrique de la vitamine C.

Le couple redox qui intervient est le suivant :



A un équivalent titrimétrique d'iode (capte 1 e^-) correspond équivalent d'acide ascorbique soit **176,1/ 2 grammes.**

Au point d'équivalence, l'excès d'iode ajouté dans le milieu sera révélé soit par la coloration brune persistante de milieu (I_3^-) soit en présence d'amidon par la formation d'un dérivé coloré en bleu-violet que donne l'iode avec l'amidon.

II. MANIPULATION

1. MATERIEL ET REACTIFS

- **Matériel (par binome)** :

  - pH mètre
  - Béchers de 100 ml
  - Erlenmeyers
  - Fiole jaugée de 50 ml
  - Tubes à essais (portoir)
  - Eprouvette graduée de 35 ml
  - Pipettes
  - Burette + support
  - Papier paraffiné

- **Réactifs communs (par paillasse) :**

  - Acide nitrique dilué
  - Solution de nitrate d'argent
  - Solution diluée d'hydroxyde de sodium
  - Solution d'acide chlorhydrique
  - Solution à 1 ppm de plomb
  - Réactif au thioacétamide.
  - Solution tampon pH 3.5
  - Eau bouillie
  - Solution d'acide sulfurique dilué
  - Solution d'amidon
  - Solution d'iode 0.1N

2. Opérations à réaliser pendant la séance de TP.

On vous demande de contrôler l'identité puis la pureté de la solution qui est mise à votre disposition dans le « Falcon identifié : acide ascorbique »

Vous limiterez votre travail à la réalisation des épreuves suivantes :

- **Identifications (2ème identification) : A - C - D**
- **Essai Métaux lourds**
- **Dosage**

3. Instructions de manipulation

- **Identifications** : à effectuer dans les tubes à essai.

Identification A :

Déterminée immédiatement après mise en solution, à 243 nm, l'absorbance spécifique est de 545 à 585.

Identification C :

Vérifier le pH de la solution S en utilisant le pH-mètre.

Identification D :

A 1 ml de solution S, ajoutez 0,2 ml d'acide nitrique dilué R et 0,2 ml de solution de nitrate d'argent R_2. Il se forme un précipité gris.

- **Essai (Métaux lourds)**

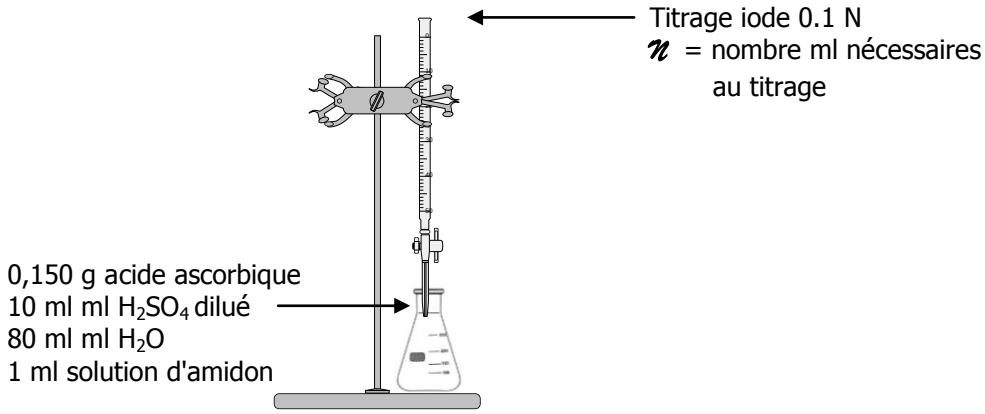
Dissolvez 2,0 g d'acide ascorbique dans de l'eau R et complétez à 20 ml avec le même solvant. 12 ml de solution satisfont à l'essai A (10 ppm). Préparez la solution témoin avec la solution à 1 ppm de plomb (Pb) R.

- **Dosage**

Dissolvez 0,150 g d'acide ascorbique dans un mélange de 10 ml d'acide sulfurique dilué R et de 80 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone R. Ajoutez 1 ml de solution d'amidon R. Titrez par l'iode 0,05 M jusqu'à coloration bleu-violet persistante.

1 ml d'iode 0,05 M correspond à 8,81 mg de $C_6H_8O_6$.

Effectuer au moins 2 titrages.


Titrage iode 0.1 N
$\mathcal{n}$ = nombre ml nécessaires au titrage
0,150 g acide ascorbique
10 ml ml H_2SO_4 dilué
80 ml ml H_2O
1 ml solution d'amidon

NB : la persistance d'une coloration bleu-violet dans la solution à titrer indique que le point d'équivalence a été atteint.

4. Compte rendu

Sur une feuille de compte rendu vierge, qui vous est remise, indiquez pour chaque épreuve réalisée :

- Vos observations, les résultats analytiques ainsi que les interprétations que vous en faites,
- La conclusion générale de votre contrôle officinal.

Pour les épreuves que vous n'avez pas effectuées vous admettrez que les résultats étaient satisfaisants.

01/2008 : 0253

PHARMACOPEE EUROPEENNE 6.0

ASCORBIQUE (ACIDE)
Acidum ascorbicum

$C_6H_8O_6$ M_r 176,1

[50-81-7]

DÉFINITION

L'acide ascorbique contient au minimum 99,0 pour cent et au maximum l'équivalent de 100,5 pour cent de (5*R*)-5-[(1*S*)-1,2-dihydroxyéthyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5*H*)-one.

CARACTÈRES

Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores se colorant par exposition à l'air et à l'humidité, facilement solubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol à 96 pour cent.

L'acide ascorbique fond en se décomposant vers 190 °C.

IDENTIFICATION

Première identification *: B, C.*

Seconde identification *: A, C, D.*

A. Dissolvez 0,10 g d'acide ascorbique dans de l'*eau R* et complétez immédiatement à 100,0 ml avec le même solvant. A 10 ml d'*acide chlorhydrique 0,1 M*, ajoutez 1,0 ml de cette solution et complétez à 100,0 ml avec de l'*eau R*. Déterminée immédiatement après la mise en solution, au maximum d'absorption à 243 nm (*2.2.25*), l'absorbance spécifique est de 545 à 585.

B. Examinez l'acide ascorbique par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (*2.2.24*), en comparant avec le spectre obtenu avec l'*acide ascorbique SCR*.

Examinez sous forme de pastilles préparées à partir de 1 mg de substance.

C. Le pH (*2.2.3*) de la solution S (voir Essai) est de 2,1 à 2,6.

D. A 1 ml de solution S, ajoutez 0,2 ml d'*acide nitrique dilué R* et 0,2 ml de *solution de nitrate d'argent R2*. Il se forme un précipité gris.

ESSAI

Solution S. Dissolvez 1,0 g d'acide ascorbique dans de l'*eau exempte de dioxyde de carbone R* et complétez à 20 ml avec le même solvant.

Aspect de la solution. La solution S est limpide (*2.2.1*) et n'est pas plus fortement colorée que la solution témoin JB_7 (*2.2.2, Procédé II*).

Pouvoir rotatoire spécifique (*2.2.7*). Dissolvez 2,50 g d'acide ascorbique dans de l'*eau R* et complétez à 25,0 ml avec le même solvant. Le pouvoir rotatoire spécifique est de + 20,5 à + 21,5.

Acide oxalique. Dissolvez 0,25 g d'acide ascorbique dans 5 ml d'*eau R*. Neutralisez au *papier tournesol rouge R* par de la *solution diluée d'hydroxyde de sodium R*. Ajoutez 1 ml d'*acide acétique dilué R* et 0,5 ml de *solution de chlorure de calcium R* (solution à examiner). Préparez comme suit la solution témoin : dissolvez 70 mg d'*acide oxalique R* dans de l'*eau R* et complétez à 500 ml avec le même solvant ; prélevez 5 ml de cette solution, ajoutez 1 ml d'*acide acétique dilué R* et 0,5 ml de *solution de chlorure de calcium R* (solution témoin). Laissez reposer les solutions pendant 1 h.

Si la solution à examiner présente une opalescence, celle-ci n'est pas plus prononcée que celle de la solution témoin (0,2 pour cent).

Substances apparentées. Les seuils indiqués sous Substances apparentées (tableau 2034.-1) dans la monographie générale *Substances pour usage pharmaceutique (2034)* ne s'appliquent pas.

Cuivre. Déterminez la teneur en cuivre par spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé 1*).

Solution à examiner. Dissolvez 2,0 g d'acide ascorbique dans de l'*acide nitrique 0,1 M* et complétez à 25,0 ml avec le même acide.

Solutions de référence. Préparez des solutions de référence, contenant respectivement 0,2 ppm, 0,4 ppm et 0,6 ppm de Cu, par dilution de la *solution à 10 ppm de cuivre (Cu) R* dans de l'*acide nitrique 0,1 M*. Mesurez l'absorbance à 324,8 nm en utilisant une lampe à cathode creuse au cuivre comme source de radiation et une flamme air-acétylène. Réglez le zéro de l'appareil en utilisant de l'*acide nitrique 0,1 M*. L'acide ascorbique ne contient pas plus de 5,0 ppm de Cu.

Fer. Déterminez la teneur en fer par spectrométrie d'absorption atomique (*2.2.23, Procédé 1*).

Solution à examiner. Dissolvez 5,0 g d'acide ascorbique dans de l'*acide nitrique 0,1 M* et complétez à 25,0 ml avec le même acide.

Solutions de référence. Préparez des solutions de référence, contenant respectivement 0,2 ppm, 0,4 ppm et 0,6 ppm de Fe, par dilution appropriée de la *solution à 20 ppm de fer (Fe) R* dans de l'*acide nitrique 0,1 M*. Mesurez l'absorbance à 248,3 nm en utilisant une lampe à cathode creuse au fer comme source de radiation et une flamme air-acétylène. Réglez le zéro de l'appareil en utilisant
de l'*acide nitrique 0,1 M*. L'acide ascorbique ne contient pas plus de 2,0 ppm de Fe.

Métaux lourds (*2.4.8*). Dissolvez 2,0 g d'acide ascorbique dans de l'*eau R* et complétez à 20 ml avec le même solvant. 12 ml de solution satisfont à l'essai A (10 ppm). Préparez la solution témoin avec la *solution à 1 ppm de plomb (Pb) R*.

Cendres sulfuriques (*2.4.14*). Déterminé sur 1,0 g d'acide ascorbique, le taux des cendres sulfuriques n'est pas supérieur à 0,1 pour cent.

DOSAGE

Dissolvez 0,150 g d'acide ascorbique dans un mélange de 10 ml d'*acide sulfurique dilué R* et de 80 ml d'*eau exempte de dioxyde de carbone R*. Ajoutez 1 ml de *solution d'amidon R*. Titrez par l'*iode 0,05 M* jusqu'à coloration bleu-violet persistante.

1 ml d'*iode 0,05 M* correspond à 8,81 mg de $C_6H_8O_6$.

CONSERVATION

En récipient non métallique, à l'abri de la lumière.

CONTRÔLE OFFICINAL DE LA STREPTOMYCINE

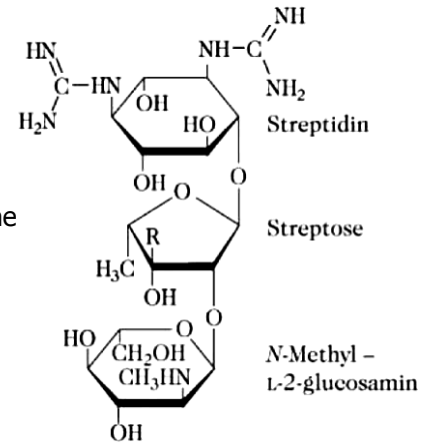
I. PROPRIETES GENERALES - PHARMACIE CHIMIQUE

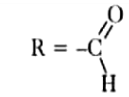
La streptomycine est un antibiotique antibactérien appartenant à la famille des aminosides ou aminocyclitols, d'origine naturelle produite par *Streptomyces griseus* ou par semi-synthèse pour la dihydrostreptomycine (DHS).

Structuralement c'est un hétéroside qui par hydrolyse libère trois constituants :

- une aglycone ou partie non osidique (la streptidine)
- un pentose (le streptose)
- un hexose aminé (la N-méthylglucosamine)

La streptomycine



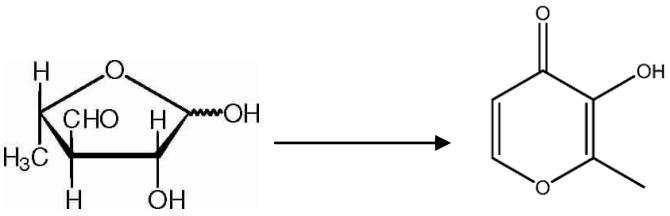


: Streptomycine

La présence des divers groupements azotés, notamment les groupements « guanidine » lui confère un caractère basique net.

La caractérisation da la streptomycine est réalisée grâce aux groupements « guanidine » par la réaction colorée de SAKAGUCHI ou réaction à l'α naphtol en présence d'un oxydant (l'hypochlorite de soude) ce qui conduit à l'apparition d'une coloration rouge (Réaction d'identification **C** de la monographie).

L'hydrolyse acide de la streptomycine libère le streptose qui se transforme en un dérivé quinonique : le maltol γ pyrone dont la structure comporte un groupement hydroxyle (-OH) à caractère phénolique, lequel en présence d'α-naphtol en milieu basique conduit à l'apparition d'une coloration rose violacée (Réaction d'identification **D** de la monographie).



Streptose Maltol (= γ pyrone)

On utilise en thérapeutique ses sels minéraux hydrosolubles, surtout le sulfate, sa dissociation libère l'ion SO_4^{2-} facilement caractérisable (voir "réactions analytique courantes") (Réaction d'identification **E** de la monographie).

II. MANIPULATION

1. MATERIEL ET REACTIFS

- **Matériel (par binome)**
  - Tubes à essais + portoir + pince en bois
  - Becs Bunsen

- **Réactifs communs**
  - Hydroxyde de sodium 1 N
  - Acide chlorhydrique
  - Solution d'α-naphtol - Solution d'hypochlorite de sodium
  - Solution de chlorure de baryum
  - Papier indicateur pH.

2. Opérations à réaliser pendant la séance de TP.

On vous demande d'effectuer le contrôle d'identité et du médicament présenté dans le récipient identifié " Streptomycine (Sulfate de) N°..."

Vous réaliserez les épreuves suivantes selon le protocole décrit dans la monographie Européenne :

- **Identifications : C - D - E**

3. Instructions de manipulation

Pour chacune des réactions, utiliser une petite quantité correspondant à une pointe de spatule, et opérer dans un tube à essai.

4. Compte rendu

Sur une feuille de compte rendu vierge, qui vous est remise, indiquez pour chaque épreuve réalisée :

- Vos observations, les résultats analytiques ainsi que les interprétations que vous en faites,
- La conclusion générale de votre contrôle.

DIHYDROSTREPTOMYCINE (SULFATE DE) POUR USAGE VÉTÉRINAIRE

Dihydrostreptomycini sulfas ad usum veterinarium

DÉFINITION

Composé principal : trisulfate de bis[N,N'''-[(1R,2R,3S, 4R,5R,6S)-4-[[5-désoxy-2-O-[2-désoxy-2-(méthylamino)-α-Lglucopyranosyl]-3-C-(hydroxyméthyl)-α-L-lyxofuranosyl]oxy]-2,5,6-trihydroxycyclohexane-1,3-diyl]diguanidine].

Sulfate d'une substance obtenue par hydrogénation catalytique de la streptomycine ou par tout autre moyen. Produit semi-synthétique dérivé d'un produit de fermentation.

Des stabilisants peuvent être ajoutés.

Teneur :

- somme du sulfate de dihydrostreptomycine et du sulfate de streptomycine : 95,0 pour cent à 102,0 pour cent (substance desséchée),
- sulfate de streptomycine : au maximum 2,0 pour cent (substance desséchée).

PRODUCTION

La méthode de production utilisée est validée pour démontrer que le produit satisferait à l'essai suivant si celui-ci était appliqué.

Toxicité anormale (*2.6.9*). Injectez à chaque souris 1 mg de substance à examiner dissous dans 0,5 ml d'*eau pour préparations injectables R*.

CARACTÈRES

Aspect : poudre hygroscopique, blanche ou sensiblement blanche

Solubilité : facilement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'acétone, dans l'éthanol à 96 pour cent et dans le méthanol.

IDENTIFICATION

Première identification *: A, E.*

Deuxième identification *: B, C, D, E.*

A. Examinez les chromatogrammes obtenus dans le dosage.

Résultats : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à son temps de rétention et ses dimensions au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

B. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

Solution à examiner. Dissolvez 10 mg de substance à examiner dans de l'*eau R* et complétez à 10 ml avec le même solvant.

Solution témoin (a). Dissolvez le contenu d'un flacon de *sulfate de dihydrostreptomycine SCR* dans 5,0 ml d'*eau R*. Prélevez 1,0 ml de cette solution et complétez à 5,0 ml avec de l'*eau R*.

Solution témoin (b). Dissolvez le contenu d'un flacon de *sulfate de dihydrostreptomycine SCR* dans 5,0 ml d'*eau R*.

Solution témoin (c). Dissolvez 10 mg de *monosulfate de kanamycine SCR* et 10 mg de *sulfate de néomycine SCR* dans de l'*eau R*, ajoutez 2,0 ml de solution témoin (b), mélangez soigneusement et complétez à 10 ml avec de l'*eau R*.

Plaque : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

Phase mobile : solution de *phosphate monopotassique R* à 70 g/l.

Dépôt : 10 µl.

Développement : sur les 2/3 de la plaque.

Séchage : dans un courant d'air chaud.

Détection : pulvérisez un mélange à volumes égaux d'une solution de *1,3-dihydroxynaphtalène R* à 2 g/l dans l'*éthanol à 96 pour cent R* et d'une solution d'*acide sulfurique R* à 460 g/l. Chauffez à 150 °C pendant 5 -10 min.
Conformité du système : solution témoin (c) :
- le chromatogramme présente 3 taches nettement séparées.
Résultats : la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner est semblable quant à sa position, sa coloration et ses dimensions à la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).
C. Dissolvez 0,1 g de substance à examiner dans 2 ml d'*eau R*, ajoutez 1 ml de *solution d'α-naphtol R* et 2 ml d'un mélange à volumes égaux de *solution concentrée d'hypochlorite de sodium R* et d'*eau R*. Il se développe une coloration rouge.
D. Dissolvez 10 mg de substance à examiner dans 5 ml d'*eau R* et ajoutez 1 ml d'*acide chlorhydrique 1 M*. Chauffez au bain-marie pendant 2 min. Ajoutez 2 ml d'une solution d'α-*naphtol R* à 5 g/l dans de l'*hydroxyde de sodium 1 M* et chauffez au bain-marie pendant 1 min. Il se développe une coloration rose violacé.
E. La substance à examiner donne la réaction (a) des sulfates (*2.3.1*).

PRODUCTION ET CONTRÔLE OFFICINAL DE L'ALCOOL A 70° & DE L'ALCOOL IODE A 1%

L'ALCOOL A 70°

Seul l'éthanol ou alcool éthylique à 60° ou 70° est utilisé comme antiseptique. Il est aussi utilisé comme solvant avec d'autres antiseptiques qu'il potentialise (iode, chlorhexidine…etc.).
L'éthanol est un alcool primaire à deux atomes de carbone de formule CH_3-CH_2OH.

L'alcool officinal est un mélange d'éthanol et d'eau. La présence d'eau est indispensable à son activité.

L'alcool utilisé comme antiseptique contient en général de 68,5° à 71,5° d'alcool absolu par volume. L'alcool absolu n'a aucune activité antiseptique. Par ailleurs il entraine d'emblée la coagulation des protéines superficielles avec formation d'une couche imperméable.

L'éthanol, est largement utilisé dans l'antisepsie de la peau saine dans le cadre de la préparation des injections parentérales où on exige la stérilité. Cette antisepsie nécessite un temps de contact de 30 secondes au minimum. L'éthanol est également employé sur les plaies et les muqueuses mais à des concentrations plus faibles. Il est également très utilisé dans la désinfection d'instruments médico-chirurgicaux.

L'éthanol à 70° est en pratique préparé par dilution soit de l'alcool absolu soit de l'alcool à 96° selon la « Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac page 58) appelée aussi : Table de mouillage de l'alcool ».

L'ALCOOL IODE A 1%

Les agents oxydants sont les composés antiseptiques les plus utilisés en médecine vétérinaire.

On classe les agents oxydants selon la puissance de leur activité antiseptique par ordre décroissant :

+ ↓ - Les composés iodés
- Les dérivés chlorés
- ↓ - Les peroxydes et les générateurs d'oxygène

L'iode est un élément chimique de la série des halogènes, de symbole I,

de masse atomique ≈ 126,9. Comme les autres halogènes, on le trouve essentiellement sous forme diatomique I_2, correspondant au di-iode. Son nom vient du grec âcre, en raison de ses vapeurs piquantes et très irritantes.
Son utilisation en antisepsie cutanée a été adoptée à partir de 1910. Son efficacité a été largement démontrée, l'utilisation de l'iode a été ensuite quelque peu délaissée du fait des inconvénients majeurs tels que sa faible solubilité dans l'eau, son action colorante...etc.
L'iode est un solide cristallin de couleur noire et d'aspect légèrement métallique, aux vapeurs violettes très irritantes.
L'iode est peu soluble dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques (les alcools, le chloroforme).
L'iode est un composé oxydant et hautement réactif. Il peut se trouver à l'état d'oxydation -1, +1, +3, +5 et +7 selon le couple redox auquel il est couplé. En solution, l'iode n'existe qu'à l'état d'oxydation -1 sous forme d'ion iodure (I^-), présent dans les sels d'iode et dans les composés organo-iodés.

Le dosage met en jeu les deux demi-équations électroniques suivantes :

Le di-iode $\mathbf{I_2}$ possède des propriétés oxydantes (accepteur d'électrons), il peut être dosé par oxydo-réduction moyennant l'utilisation d'un réducteur : le thiosulfate de sodium $Na_2S_2O_3$ (donneur d'électrons).

Demi-équations : $I_2 + 2\ e^- \rightleftharpoons 2\ I^-$

$2\ S_2O_3^{2-} \rightleftharpoons S_4O_6^{2-}{}_{(aq)} + 2\ e^-$

Equation : $I_2 + 2\ S_2O_3^{2-} \rightleftharpoons S_4O_6^{2-} + 2\ I^-$

Notez qu'une solution d'iode molaire est 2 fois normale.

D'ou l'équation : $2\ n(I_2) = n(S_2O_3^{2-})$ soit $2\ C_i.V_i = C.V_.$

1 ml de thiosulfate de sodium 0,1 M correspond à 12,69 mg d'iode.
Teneur (en g pour 100 g) en iode C_i :

$$\frac{V \times C \times (25{,}38/2)}{m}$$

$V_{éq.}$ = volume versé en ml de thiosulfate de sodium 0,1 M,
C1 = titre exact du thiosulfate de sodium 0,1 M,
m = prise d'essai d'alcool iodé en g.

A l'équivalence, I_2 à doser et le thiosulfate de sodium $Na_2S_2O_3$ titrant versé ont été complètement consommés.

II. MANIPULATION

1. Opérations à réaliser pendant la séance de TP.

On vous demande de :

- Préparer une solution d'Alcool officinal à 70°
- D'effectuer le contrôle officinal du médicament présenté dans le récipient identifié " Alcool Iodé à 1% "

- Vous réaliserez les épreuves suivantes selon le protocole décrit dans la monographie du Formulaire National Français " Alcool Iodé à 1% " :

  - **Identification :** A, B et C
  - **Dosage**

2. MATERIEL ET REACTIFS

▪ Matériel (par binôme)

- Béchers
- fiole conique = Erlenmeyer
- Pipettes graduées
- Burette graduée
- Eprouvettes

▪ Réactifs communs

- Solution d'amidon R,
- Acide sulfurique dilué R,
- Solution de dichromate de potassium R,
- Eau R,
- Chloroforme R,
- Iodure de potassium,
- Iode,
- Alcool 96 p. cent,
- Thiosulfate de sodium 0,1 M.
- Carbonate de sodium R,
- Acide tartrique R,
- Sulfure de sodium

3. Instructions de manipulation

- Rincer la burette à l'eau distillée, puis avec la solution aqueuse de thiosulfate de sodium.
- Remplir la burette avec la solution aqueuse **titrante** de thiosulfate de sodium de concentration connue avec précision.

Dans l'erlenmeyer on place :

- un volume de solution à **titrer** d'alcool iodé (≈ 10,00 g d'alcool iodé) commerciale de concentration C_i à déterminer.
- Ajoutez 20 ml d'eau R et 1 ml d'acide sulfurique dilué R.
- Titrez par le thiosulfate de sodium 0,1 M en présence de solution d'amidon R. Verser la solution titrante jusqu'à observer un changement de couleur (point d'équivalence).

4. Compte rendu

Sur une feuille de compte rendu vierge, qui vous est remise, indiquez pour chaque épreuve réalisée :

- Vos observations, les résultats analytiques ainsi que les interprétations que vous en faites,
- La conclusion générale de votre contrôle.

Formulaire National Français 2012
Monographie 2007

ALCOOL IODE A 1 POUR CENT

La préparation satisfait à la monographie Préparations liquides pour application cutanée (0927).

DEFINITION

Formule :

Composants	Quantité	Fonction	Référentiel
Iode	1,00 g	Substance active	Ph. Eur.
Potassium (iodure de)	0,60 g	Solvant	Ph. Eur.
Éthanol à 96 pour cent *V/V*	54,7 g	Excipient	Ph. Eur.
Eau purifiée q.s.p.	100,0 g	Excipient	Ph. Eur.

Dans le cas d'utilisation d'éthanol a` 90 pour cent V/V, il convient de se référer aux Tables alcoométriques (VIII.C) de la Pharmacopée française.

Teneur :
- iode libre : 0,95 a` 1,05 pour cent m/m,
- iodure de potassium : 0,57 a` 0,63 pour cent m/m.

PRODUCTION
Précaution : utilisez des récipients de verre pour la préparation. Dissolvez l'iodure de potassium puis l'iode dans 5 ml d'eau purifiée ; agitez et ajoutez la quantité d'alcool indiquée. Complétez avec de l'eau purifiée.

CARACTERES
Aspect : liquide limpide brun foncé, à odeur d'éthanol et d'iode.

IDENTIFICATION
Solution S. Dans une capsule en porcelaine, introduisez 10 ml d'alcool iodé, évaporez à siccité au bain-marie puis chauffez légèrement jusqu'à l'obtention d'un résidu blanc. Laissez refroidir puis reprenez le résidu par 4 ml d'eau R.
A. La solution S donne la réaction (b) du potassium (2.3.1).
B. La solution S donne la réaction (b) des iodures (2.3.1).
C. A 0,1 ml d'alcool iodé ajoutez 9 ml d'eau R et 1 ml de solution d'amidon R. Il se produit une coloration violette (iode).

D. Dans un tube a` essai, introduisez 1,0 ml d'alcool iodé et ajoutez 1 ml d'une solution de permanganate de potassium R à 10 g/l et 0,25 ml d'acide sulfurique dilué R. Couvrez immédiatement d'un papier filtre préalablement humecté d'une solution fraîchement préparée contenant 0,1 g de nitroprussiate de sodium R et 0,5 g d'hydrate de pipérazine R dans 5 ml d'eau R. Il se développe après quelques minutes une coloration bleue qui disparaît après 10 min à 15 min.

ESSAI

Densité (2.2.5) : 0,917 a` 0,928.

Acidité : A effectuer si la préparation n'est pas extemporanée.

A 25,0 ml d'alcool iodé, ajoutez 25 ml d'eau exempte de dioxyde de carbone R. Décolorez l'iode par addition de 0,56 g de thiosulfate de sodium R puis titrez par l'hydroxyde de sodium 0,1 M en présence de 0,25 ml de solution de phénolphtaléine R jusqu'à coloration rose. Le volume d'hydroxyde de sodium 0,1 M utilisé n'est pas supérieur à 2,0 ml.

DOSAGE

Iode. Dans une fiole conique, introduisez 10,00 g d'alcool iodé. Ajoutez 20 ml d'eau R et 1 ml d'acide sulfurique dilué R. Titrez par le thiosulfate de sodium 0,1 M en présence de solution d'amidon R.

1 ml de thiosulfate de sodium 0,1 M correspond à 12,69 mg d'iode.

Teneur (en g pour 100 g) en iode :

$$\frac{V \times C \times 12{,}6}{m}$$

V = volume versé en ml de thiosulfate de sodium 0,1 M,
C = titre exact du thiosulfate de sodium 0,1 M,
m = prise d'essai d'alcool iodé en g (1g).

CONSERVATION

A l'abri de la lumière, en récipient de verre opaque.

ETIQUETAGE

L'étiquette indique le ou les excipients à effet notoire présents figurant sur la liste en vigueur. L'étiquette indique en outre que la préparation contient de l'iode.

CLASSE THERAPEUTIQUE

Usage dermatologique : antiseptique et désinfectant.

Classe ATC : D08A G (produits a` base d'iode).

Réaction (b) des iodures :

A 0,2 ml de la solution prescrite, ajoutez 0,5 ml d'acide sulfurique dilué R ; 0,1 ml de solution de dichromate de potassium R, 2 ml de d'eau R et 2 ml de chloroforme R. Agitez pendant quelques secondes et laisser reposer. La couche de chloroforme est de couleur violette ou rouge-violet.

Réaction (a) du potassium :

On dissout 0,1 g de la substance à examiner dans 2 ml d'eau ou utiliser 2 ml de la solution à examiner. Ajouter 1 ml de solution carbonate de sodium R, chauffez. Aucun précipité ne se forme. Ajouter à la solution chaude 0,05 ml de sulfure de sodium R. Aucun précipité ne se forme. Refroidir à l'eau glacée et ajouter 2 ml d'une solution de d'acide tartrique à 150 g/l. Un précipité cristallin blanc est formé.

Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool

		Concentration initiale													
		100	**99**	**98**	**97**	**96**	**95**	**90**	**85**	**80**	**75**	**70**	**65**	**60**	**50**
Concentration finale	**95**	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	**105,34**	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
	15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64
	10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale x **(en bleu)** pour obtenir la concentration désirée.

Exemple : la table indique qu'il faut ajouter 105,34 ml d'eau à 100 mL d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°.
Attention : Le volume final est inférieur à la somme des volumes mis en jeu ! C'est le phénomène dit de « contraction de volume », variable en fonction du titre de l'alcool initial.

MANIPULATIONS DE TOXICOLOGIE

RECHERCHE TOXICOLOGIQUE DU CHLORALOSE

Un chat de race commune, âgé de 2 ans, correctement vacciné a été présenté à la consultation, dans un état comateux, pour des troubles nerveux.

D'après le propriétaire, le chat a présenté :

- Abattement et anorexie
- Mousse abondante dans la cavité buccale
- Tremblements, pédalage continu

L'examen clinique a révélé :

- Une hypothermie marquée : 36°C
- Un état comateux entrecoupé de phases d'excitation avec pédalage des membres antérieurs

Prélèvement réalisé : Urine

- Présentez votre démarche diagnostique.
- Effectuez une recherche toxicologique afin de confirmer ou infirmer une suspicion d'intoxication et exposez vos résultats.
- Proposez éventuellement une attitude thérapeutique.

GENERALITES SUR LE CHLORALOSE

Le chloralose (ou glucochloral) est un composé organique artificiel trichloré, résultant de la condensation d'une molécule de glucose avec une molécule de chloral (Figure 1).

En Tunisie, il est utilisé exclusivement comme raticide et souricide : Raticide 70® (Photo 1).

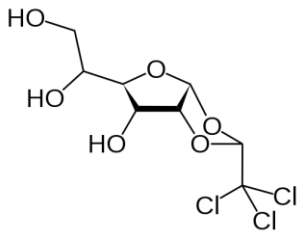
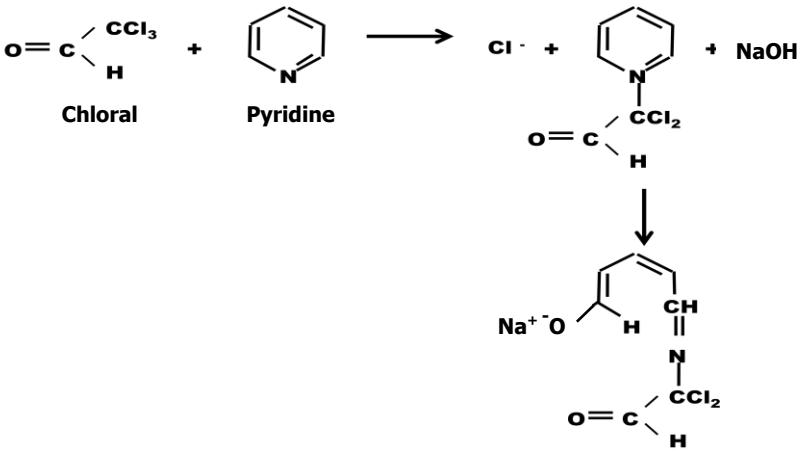


Figure 1 : Le chloralose

Photo 1
Raticide 70®

1. PRINCIPE DE LA RECHERCHE TOXICOLOGIQUE

L'hydrolyse acide du chloralose libère d'une part du glucose et d'autre part du chloral dont le groupement trichloré peut être caractérisé par la réaction FUJIWARA-ROSS.

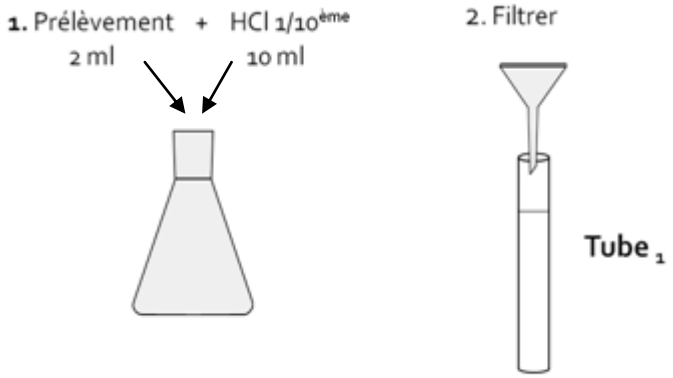


2. MODE OPERATOIRE :

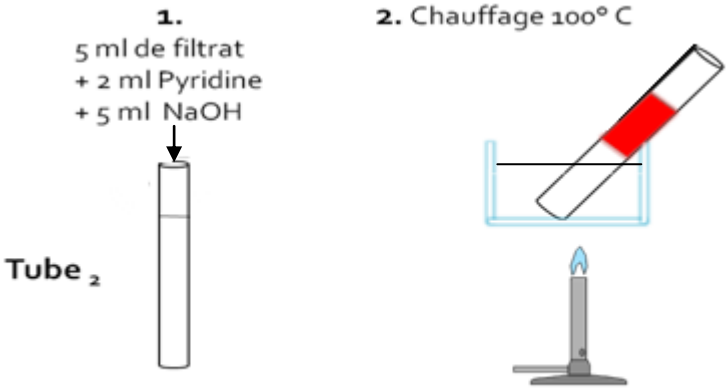
La recherche sera conduite sur un prélèvement d'urine.

- utiliser quelques ml du prélèvement qui vous est fourni et les placer dans un erlenmeyer. Ajouter environ 20 ml d'HCl dilué et porter l'erlenmeyer quelques minutes à l'ébullition douce.
- filtrer sur un papier filtre en recueillant le filtrat dans un tube à essai T_1
- verser 5 ml du filtrat dans un second tube à essai T_2 propre, ajouter successivement 2 ml de pyridine (utiliser la petite pipette en polyéthylène prévue pour cela) puis 5 ml de lessive de soude, éviter tout contact avec le mélange (utiliser les bouchons de caoutchouc prévus pour cette opération).
- porter le tube T2 au bain marie bouillant

i. Extraction :



ii. Caractérisation :



3. RESULTAT :

Si le prélèvement contient du chloralose, il apparait dans la minute qui suit une coloration rouge dans la phase supérieure pyridinique

Photo
Réaction de FUJIWARA-ROSS positive
(Pharmacie et Toxicologie) ENMV ST.

N.B :

- Cette réaction n'est pas spécifique du chloralose, mais générale aux composés bichlorés et trichlorés.
- Démarche diagnostique : confrontation d'éléments épidémiologiques, cliniques et analytiques.

RECHERCHE TOXICOLOGIQUE DU METALDEHYDE

Un chien de race commune, âgé de 2 ans, correctement vacciné a été présenté à la consultation, dans un état comateux, pour des troubles nerveux. Le chien est mort sans qu'aucun traitement n'ait pu être entrepris.

D'après le propriétaire, le chien a présenté :

- Abattement et anorexie
- Hypersalivation
- Vomissements
- Troubles de comportement
- Tremblements, pédalage continu

L'examen nécropsique révèle :

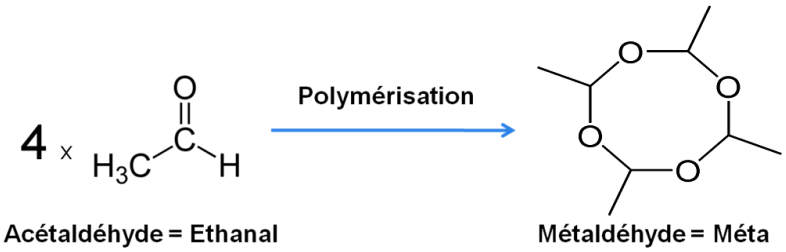
- Congestion généralisée du cadavre
- Dégénérescence hépato-rénale
- Gastroentérite hémorragique

Prélèvement réalisé : appât empoisonné ramené par le propriétaire

- Présentez votre démarche diagnostique.
- Effectuez une recherche toxicologique afin de confirmer ou infirmer une suspicion d'intoxication et exposez vos résultats.

GENERALITES SUR LE METALDEHYDE

Le métaldéhyde est un tétramère cyclique de l'acétaldéhyde utilisé comme combustible sous la forme de plaques solides blanches, ou comme appât empoisonné hélicide (granulés bleus en général). Il provoque assez fréquemment des intoxications chez le chien.



La recherche toxicologique est effectuée sur les viscères : foie, rein, contenu stomacal ou sur des appâts suspects.

1. PRINCIPE DE LA RECHERCHE TOXICOLOGIQUE

i. Extraction :

- Le métaldéhyde est extrait par le chloroforme

ii. Caractérisation :

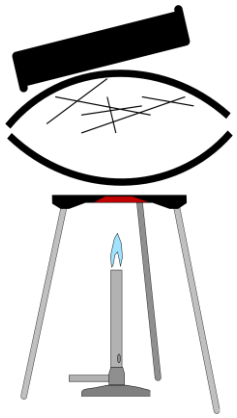
- Le solvant est évaporé et le métaldéhyde est sublimé vers 110 °C entre deux verres de montre. Le métaldéhyde se dépose sur le verre de montre supérieur en formant des aiguilles blanches caractéristiques
- Ces aiguilles donnent avec du gaïacol en présence d'acide sulfurique une coloration rouge framboise : Réaction de Denigès, très sensible, mais spécifique seulement après la sublimation puisque le paraldéhyde (trimère de l'acétaldéhyde) ainsi que certains glucides peuvent la donner.

2. MODE OPERATOIRE :

Le prélèvement (10 g d'appât empoisonné), est trituré au mortier avec environ un quart de son volume de chloroforme.
Pour réaliser l'extraction à partir de l'appât suspect (ce qui fera l'objet de la manipulation de Travaux Pratiques), on place le prélèvement trituré dans une ampoule à décanter et on effectue deux ou trois extractions successives avec 25 ml de chloroforme. L'extrait chloroformique est par la suite récupéré dans un bécher et concentré sur un bain de sable (le volume est ramené à 5 ml par évaporation à 60°C)

L'extrait concentré est par la suite placé dans un verre de montre rodé (VM1).
On place sur le premier verre de montre (VM1), un deuxième verre de montre rodé (VM2), de même taille, en tournant la partie concave vers le bas.
Sur la partie supérieure de (VM2), on dépose un tampon de papier filtre humide tandis que la partie inférieure est chauffée pendant 3 à 5 mn à une température comprise entre 100 et 110°C.
Ceci peut se réaliser sur un bain de sable ou sur la flamme d'un Bec Bunsen.
Le métaldéhyde lorsqu'il est présent, sublime et vient se déposer sur la face interne de (VM2), sous forme d'aiguilles blanches caractéristiques, bien visibles notamment sur fond noir.

Ces aiguilles blanches mises en présence d'une goutte d'acide sulfurique et d'une gouttelette de gaïacol donnent une coloration rouge sang (Réaction de Denigès).



Réaction de Denigès :

- Gaïacol + H_2SO_4
- coloration rouge sang
- Spécifique seulement après sublimation car le paraldéhyde et certains glucides peuvent la donner.

3. RESULTAT :

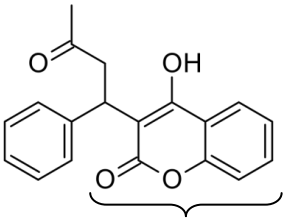
La proportion de métaldéhyde retrouvée par cette méthode, par rapport à la quantité ingérée, est toujours très faible. Une réaction positive obtenue à partir du foie ou du contenu gastro-intestinal permet de confirmer un suspicion d'intoxication.

N.B :

- Démarche diagnostique : confrontation d'éléments épidémiologiques, cliniques, nécropsiques et analytiques.

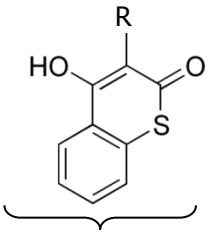
RECHERCHE TOXICOLOGIQUE DES RODENTICIDES ANTICOAGULANTS

Les rodenticides anticoagulants sont des composés organiques artificiels dérivant de différents noyaux structuralement proches, les noyaux : hydroxy 4 coumarine, hydroxy 4 benzothiopyranone et indane dione.



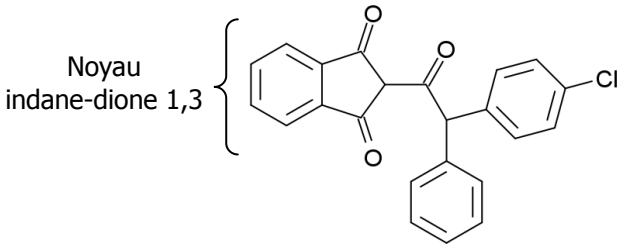
Noyau hydroxy 4 coumarine

Le coumafène (warfarine)



Noyau hydroxy 4 benzothiopyranone

La diféthialone



La chlorophacinone

Ils se caractérisent sur le plan biologique par des propriétés anticoagulantes qui ne se manifestent qu'in vivo.

Ces propriétés sont à l'origine de leur usage dans la lutte contre les rongeurs nuisibles.

Cet usage est à l'origine d'intoxications fréquentes chez les animaux domestiques, en particulier les carnivores et surtout le chien.

La recherche toxicologique des anticoagulants est effectuée sur appâts suspects ou sur prélèvement biologique (contenu stomacal, foie, sang…). Dans ce dernier cas elle doit être rapide car vu leur toxico-cinétique. Leur recherche est inutile après le 5ème jour.

PRINCIPE

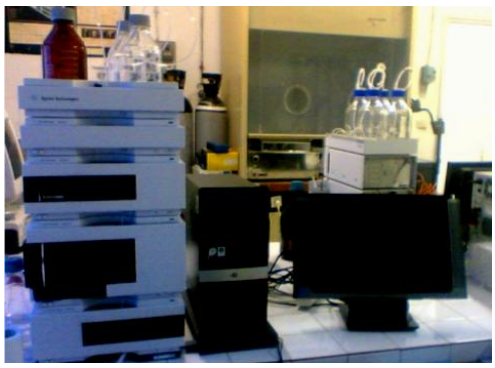
La recherche toxicologique de ces composés est délicate. Elle comporte deux étapes : l'extraction et la caractérisation.

1. L'extraction

- Le prélèvement est acidifié et extrait par un mélange d'isooctane et de dichlorométhane (95/5). En milieu acide la forme non ionisée prédomine et les anticoagulants sont plus solubles dans les solvants organiques que dans l'eau. Par contre c'est l'inverse en milieu alcalin.
- En ajoutant une solution concentrée de soude (pH=12). Les anticoagulants repassent dans l'eau.
- Après ces deux premiers passages l'extrait n'est pas assez pur et l'opération précédente est recommencée avec un autre milieu organique : l'éther. L'extrait aqueux précédemment obtenu est acidifié par HCl et l'extrait par l'éther
- La phase éthérée est évaporée au bain marie à 36°C, le résidu est repris dans du méthanol à partir duquel la caractérisation est effectuée.

2. Caractérisation

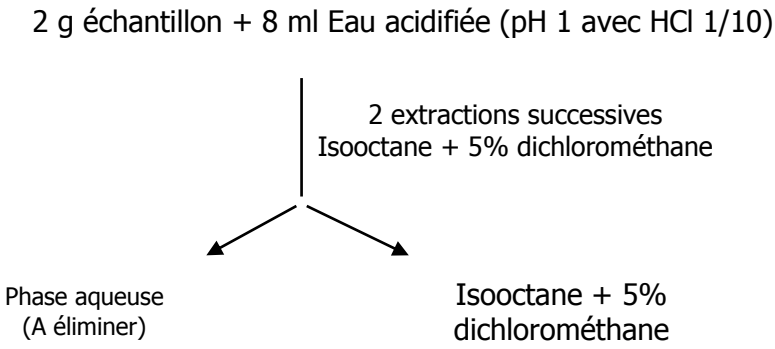
Les méthodes de recherche pour la caractérisation des anticoagulants rodenticides sont la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la chromatographie sur la couche mince (CCM).



Chromatographe en Phase Liquide
à Haute Performance
[Service de Pharmacie et Toxicologie - ENMV]

METHODE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DES RODENTICIDES ANTICOAGULANTS

- **Extraction**


2 g échantillon + 8 ml Eau acidifiée (pH 1 avec HCl 1/10)
2 extractions successives
Isooctane + 5% dichlorométhane
Phase aqueuse
(A éliminer)
Isooctane + 5%
dichlorométhane

- **Purification**